

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 9 月 12 日 (12.09.2003)

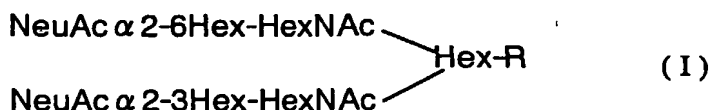
PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/074570 A1

- (51) 国際特許分類: C08B 37/00, (SUZUKI, Yasuo) [JP/JP]; 〒420-0911 静岡県 静岡市  
A61K 31/715, A61P 31/16 瀬名 1 丁目 8 番 3-102 Shizuoka (JP). 左一八  
(JWA, Ilpal) [KR/JP]; 〒424-0857 静岡県 清水市 川原  
町 2 1-1 1-4 0 2 Shizuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/02338
- (22) 国際出願日: 2003 年 2 月 28 日 (28.02.2003) (74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042  
東京都 渋谷区 宇田川町 3 7-1 0 麻仁ビル 6 階  
Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CN, JP, US.
- (30) 優先権データ: 特願2002-057909 2002 年 3 月 4 日 (04.03.2002) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE, SI, SK, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術  
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY  
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市  
本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 鈴木 康夫 のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL BRANCHED SIALO-SUGAR MOLECULES AND ANTIVIRAL AGENTS USING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規分岐状シアロ糖分子とそれを用いたウイルス剤



and virus elimination filters whereby the infection with type A influenza virus and type B influenza virus originating in any animals including humans can be prevented: (I) wherein NeuAc represents N-acetylneuraminate in which the hydroxyl, carboxyl and amido may be chemically modified with halogeno, alkyl and acyl-either identically or separately; Hex represents hexose; HexNAc represents N-acetylhexosamine; and R represents hydrogen, hydrocarbonyl, a sugar chain, or a substrate selected from among lipids, proteins and synthetic polymers, each optionally being substituted; provided that the bond between N-acetylneuraminate and hexose may be either an O-glycoside bond occurring in nature or a chemically converted bond such as an S-glycoside or Se-glycoside bond.

(57) Abstract: It is intended to provide novel branched sialo-sugar molecules represented by the following general formula (I) as substances which respond to variations in the host area of influenza viruses as well as variations in antigenicity and are useful as adsorbents in drugs

[続葉有]

Best Available Copy

WO 03/074570 A1

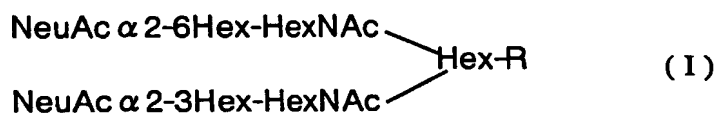


5061469



(57) 要約:

インフルエンザウイルスの宿主域の変異や抗原性の変異にも対応し、あらゆる人および動物由来のA型インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスの感染を阻止できる医薬品やウイルス除去用フィルター等の吸着剤として有用な物質として、次式 (I)



(ただし、NeuAc は、その水酸基、カルボキシル基およびアミド基が、同一または別異にハロゲン基、アルキル基およびアシル基で化学的に修飾されていてもよいN-アセチルノイラミン酸を表し、Hex はヘキソース、HexNAc はN-アセチルヘキソサミンを表し、R は水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、R は置換基を有していてもよい。また、N-アセチルノイラミン酸とヘキソースとの結合は、天然に存在する O-グリコシド結合であっても、S-グリコシド、Se-グリコシド結合等の化学的に変換された結合であってもよい。) で表される新規分岐状シアロ糖分子を提供する。

## 明 細 書

## 新規分岐状シアロ糖分子とそれを用いた抗ウイルス剤

## 5 技術分野

この出願の発明は、新規分岐状シアロ糖分子に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、インフルエンザウイルスの宿主域の変異や抗原性の変異に対応でき、すべてのヒトおよび動物由来の A 型インフルエンザウイルスおよび B 型インフルエンザウイルスの感染、ならびにインフルエンザの流行を阻止できる医薬品やウイルス除去用フィルター等の吸着剤として有用な新規分岐状シアロ糖分子に関するものである。

## 背景技術

15 日本におけるインフルエンザ感染者は、毎年数 10 万人～100 万人を超える。1918 年のスペイン風邪（遺伝子解析により H1N1 型インフルエンザウイルスによることが判明）は、世界で年間に少なくとも 2000 万人、日本でも 38 万人以上を死亡させ、人類史上最悪、最大の自然災害と位置付けられている。

20 また、近年では、インフルエンザが特に高齢者においては気管支炎や肺炎を併発して重症化させ、小児においては脳炎や脳症を引き起こすことなどが報告されており、冬季における疾患の制圧は世界的に急務となっている。

インフルエンザの病原体は、インフルエンザウイルスであり、  
25 インフルエンザウイルスには内部タンパク質の抗原性の違いにより A、B、C 型の 3 種類が知られている。B、C 型は主にヒト

から分離されるが、A型ウイルスは、ヒト以外にも野生水鳥、家禽類、ブタ、ウマ、アザラシ、クジラ、フェレットなど自然界の多くの動物種から分離され、最も病原性が高く、世界的流行を起こしている。

- 5     インフルエンザウイルスは、分節状の単鎖RNAをゲノムとする。一般に1本鎖RNAの配列を読み取るRNAポリメラーゼによる複製は、通常の2本鎖DNAを読み取るDNAポリメラーゼによる複製に比べ、格段に「間違い」を起こしやすいことが知られている (Steinhauer, D.A., Holland, J.J.: *Annual Review of*  
10 *Microbiology*, 41, 409-433 (1987); Gojobori, T., Yamaguchi, Y., Ikeo, K., Mizokami, M.: *Japanese Journal of Genetics*, 69, 481-488 (1994))。そのため、ウイルスが宿主細胞内で増殖すると、同時に新たな変異ウイルスが生まれてしまう。このような変異によりウイルスタンパク質の抗原性が少しずつ変化するため、  
15 インフルエンザウイルスは通常の免疫監視機構には検知されない場合が多く、毎年流行するのである。

- インフルエンザウイルスの変異には、前記の抗原性の連続変異 (Antigenic Drift) 以外に、宿主域の変異 (Antigenic Shift) (Suzuki, Y.: *Progress in Lipid Research*, 33, 429-457 (1994))  
20 がある。インフルエンザウイルスの遺伝子は、一つにつながっておらず、分節状であるため、例えばヒトとカモのインフルエンザウイルスがブタに同時感染するとブタ体内で両者の遺伝子再集合体が生まれ、全く新しい型 (抗原性) を有するウイルスが生まれることがある。そして、ヒトはこのようなウイルスに対する抗  
25 体を全く持たないために、ヒトが新しいウイルスに感染すると世界的に大流行する危険性がある。

インフルエンザウイルスの感染は、ウイルス糖タンパク質であるヘマグルチニン（HA）が宿主細胞表面に存在するシアル酸含有糖鎖に結合することにより起こることが知られている（Suzuki, Y.: *Progress in Lipid Research*, 33, 429-457 (1994); Paulson, J.C.: *The Receptors*, Vol.2. Academic Press, Orlando, pp.131-219 (1985); Wiley, D.C. and Skehel, J.J.: *Annual Review of Biochemistry*, 56, 365-394 (1987)）。そこで、従来、このシアル酸含有糖鎖が研究され、抗インフルエンザウイルス剤として各種のシアル酸含有糖鎖（シアロ糖鎖）化合物が報告されている（Fujimoto, K., Hayashida, O., Aoyama, Y., Guo, C.T., Hidari, K. I. P. J., and Suzuki, Y.: *Chemistry Letter*, 1259-1260 (1999); Suzuki, Y., Sato, K., Kiso, M., and Hasegawa, A.: *Glycoconj J.* 7, 349-54 (1990)）。しかし、これらの化合物は、いずれも、一つの型のウイルスに対してのみ抗インフルエンザウイルス性を示すものであり、複数の型のウイルスが同時に流行するという現状においては、その有効性に限界があったのが実情である。

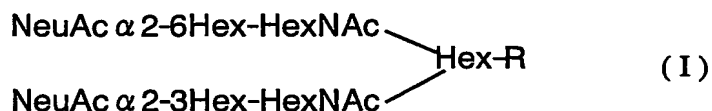
また、インフルエンザウイルスの動物種間の伝播による宿主域の変異や宿主が持つインフルエンザウイルス抗体による抗原性の変異にも対応できる抗インフルエンザ剤は、これまでのところ開発されていない。

したがって、この出願の発明は、以上のとおりの問題点を解決し、インフルエンザウイルスの宿主域の変異や抗原性の変異にも対応し、あらゆるヒトおよび動物由来のA型インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスの感染ならびにインフルエンザの流行を阻止できる医薬品やウイルス除去用フィルタ

一等の吸着剤として有用な物質を提供することを課題としている。

#### 発明の開示

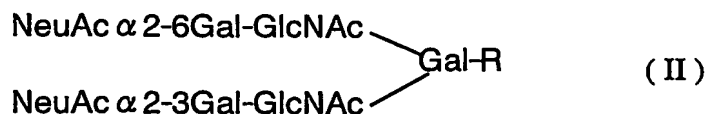
- 5 この出願の発明は、以上のとおりの課題を解決するものとして、  
第1には、次式（I）



- （ただし、NeuAc は、その水酸基、カルボキシル基およびアミド  
基が、同一または別異にハロゲン基、アルキル基またはアシル基  
10 で化学的に修飾されていてもよいN－アセチルノイラミン酸を  
表し、Hex はヘキソース、HexNAc はN－アセチルヘキソサミンを  
表し、R は水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合  
成高分子から選択される基質であり、R は置換基を有していても  
よい）で表されることを特徴とする新規分岐状シアロ糖分子を提  
15 供する。

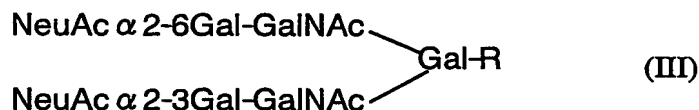
- この出願の発明は、第2には、N－アセチルノイラミン酸とヘ  
キソースが天然の 0-グリコシド結合により結合している前記の  
新規分岐状シアロ糖分子を、第3には、N－アセチルノイラミン  
酸とヘキソースの結合が化学的に変換された結合である前記の  
20 新規分子状シアロ糖分子を、また、第4には、N－アセチルノイ  
ラミン酸とヘキソースの結合形態が S-グリコシド結合または Se-  
グリコシド結合から選択される前記の新規分子状シアロ糖分子  
を提供する。

この出願の発明は、第5には、次式（II）



(ただし、NeuAc は、その水酸基、カルボキシル基およびアミド基が、同一または別異にハロゲン基、アルキル基またはアシル基で化学的に修飾されていてもよい N-アセチルノイラミン酸を表し、Gal はガラクトース、GlcNAc は N-アセチルグルコサミンを表し、R は水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、R は置換基を有していてもよい) で表されることを特徴とする新規分岐状シアロ糖分子を提供する。

さらに、第 6 には、この出願の発明は、次式 (III)



(ただし、NeuAc は、その水酸基、カルボキシル基およびアミド基が、同一または別異にハロゲン基、アルキル基またはアシル基で化学的に修飾されていてもよい N-アセチルノイラミン酸を表し、Gal はガラクトース、GalNAc は N-アセチルガラクトサミンを表し、R は水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、R は置換基を有していてもよい) で表されることを特徴とする新規分岐状シアロ糖分子を提供する。

この出願の発明は、第 7 には、N-アセチルノイラミン酸とガラクトースが、天然の O-グリコシド結合により結合している前記いずれかの新規分岐状シアロ糖分子を、第 8 には、N-アセチルノイラミン酸とガラクトースの結合が、化学的に変換された結合である前記いずれかの新規分子状シアロ糖分子を、さらに、第 9

には、N-アセチルノイラミン酸とガラクトースの結合形態が S-グリコシド結合または Se-グリコシド結合である前記の新規分子状シアロ糖分子を提供する。

- そして、この出願の発明は、第 10 には、少なくとも前記いずれかの新規分岐状シアロ糖分子を有効成分として含有することを特徴とする抗ウイルス剤をも提供する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、この出願の発明の実施例において、インフルエンザ A 型ウイルスおよびインフルエンザ B 型ウイルスの孵化鶏卵しょう尿膜に由来する酸性糖脂質との結合性試験（二次元展開）の結果を示す写真である。（a : virus (-)、b : orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  試薬により発色、c : A/PR/8/34 との結合性、d : A/Aichi/2/68 との結合性、e : B/Lee/40 との結合性、f : B/Gifu/2/73 との結合性；  
S : 標準糖脂質 = bovine brain total gangliosides、S1 :  $\alpha$ 2-6 シアリルパラグロボシド、S2 :  $\alpha$ 2-3 シアリルパラグロボシド、1st : 一次展開 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/88\% \text{HCOOH}$  (65/25/10, v/v/v))、2nd : 二次展開 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/5\text{N NH}_4\text{OH}$  (5/4/1, v/v/v))；矢印：インフルエンザウイルスに共通して反応した糖脂質)

図 2 は、この出願の発明の実施例において、Iatrobeads カラムクロマトグラフィーにより精製した孵化鶏卵しょう尿膜に由来する酸性糖脂質とインフルエンザ A 型ウイルスおよびインフルエンザ B 型ウイルスの結合性試験 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12\text{mM MgCl}_2$  (5/4/1, v/v/v)) の結果を示す写真である。（a : virus (-)、b : orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  試薬により発色、c : A/Memphis/1/7 との結合性、d : A/PR/8/34 との結合性、e : A/Aichi/2/68 との結合性、f :



A/Duck/313/4

との結合性、g : A/Duck/92/1/76 との結合性、h : B/Lee/40 との結合性 ; S : 標準糖脂質 = bovine brain total gangliosides + GM3、S1 :  $\alpha$  2-6 シアリルパラグロボシド、S2 :  $\alpha$  2-3 シアリルパラグロボシド ; 1 ~ 7 : フラクション ; 矢印 : 目的の糖脂質)

- 5 図 3 は、この出願の発明の実施例において、孵化鶏卵しょう尿膜に由来する酸性糖脂質とインフルエンザ A 型ウイルスの結合性試験 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12\text{mM MgCl}_2/15\text{M NH}_4\text{OH}$  (50/40/7/3, v/v/v)) の結果を示す写真である。(a : orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  試薬により発色、b : A/Memphis/1/71 との結合性、c : A/PR/8/34 との結合性 ; S1 :  
10  $\alpha$  2-6 シアリルパラグロボシド、S2 :  $\alpha$  2-3 シアリルパラグロボシド、AM : 孵化鶏卵しょう尿膜由来の精製糖脂質)

- 図 4 は、この出願の発明の実施例において、MDCK 細胞由来の酸性糖脂質とインフルエンザ A 型ウイルスおよびインフルエンザ B 型ウイルスの結合性試験 (二次元展開) の結果を示す写真である。(a : virus (-)、b : orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  試薬により発色、c :  
15 A/PR/8/34 との結合性、d : A/Aichi/2/68 との結合性、e : B/Lee/40 との結合性、f : B/Gifu/2/73 との結合性 ; S : 標準糖脂質 = bovine brain total gangliosides、S1 :  $\alpha$  2-6 シアリルパラグロボシド、S2 :  $\alpha$  2-3 シアリルパラグロボシド、1st : 一次展開 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/88\%$   
20  $\text{HCOOH}$  (65/25/10, v/v/v))、2nd : 二次展開 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/5\text{N NH}_4\text{OH}$  (5/4/1, v/v/v)) ; 矢印 : インフルエンザウイルスに共通して反応した糖脂質)

- 図 5 は、この出願の発明の実施例において、孵化鶏卵しょう尿膜に由来する酸性糖脂質の latrobeads カラムクロマトグラフィーの流出プロファイルを示す写真である。(展開溶媒 :  
25  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12\text{mM MgCl}_2$  (5/4/1, v/v/v) ; orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  試薬によ

り発色) (矢印: インフルエンザウイルスとの反応性を示した糖脂質; 1~7: フラクション)

図6は、この出願の発明の実施例において、latrobeads カラムクロマトグラフィーにより精製した孵化鶏卵しょう尿膜に由来する酸性糖脂質とインフルエンザA型ウイルスの結合性試験 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/12mM MgCl<sub>2</sub> (5/4/1, v/v/v)) の結果を示す写真である。(a: virus(-)、b: orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 試薬により発色、c: A/Aichi/2/68 との結合性、d: A/Memphis/1/71 との結合性; S1: α2-6 シアリルパラグロボシド、S2: α2-3 シアリルパラグロボシド; 1~7: フラクション)

図7は、この出願の発明の実施例において、プールされた糖脂質の latrobeads カラムクロマトグラフィーの流出プロファイルを示す写真である。(展開溶媒: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/12mM MgCl<sub>2</sub> (5/4/1, v/v/v); orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 試薬により発色) (矢印: インフルエンザウイルスとの反応性を示した糖脂質)

図8は、この出願の発明の実施例において、調製用 TLC により精製した糖脂質の TLC 結果を示す写真である。(展開溶媒: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/12mM MgCl<sub>2</sub> (5/4/1, v/v/v); orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 試薬により発色) (S: bovine brain total gangliosides)

図9は、この出願の発明の実施例において、調製用 TLC により精製した孵化鶏卵しょう尿膜由来の糖脂質とインフルエンザA型ウイルスの結合性試験の結果を示す写真である。(a: virus(-)、b: orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 試薬により発色、c: A/Aichi/2/68 との結合性、d: A/PR/8/34 との結合性、e: A/Memphis/1/71 との結合性; S1: α2-6 シアリルパラグロボシド、S2: α2-3 シアリルパラグロボシド; 1~5: AM番号; 矢印: いずれのインフ

ルエンザウ

イルスとも特異的に反応した糖脂質)

図 10 は、この出願の発明の実施例において、調製用 TLC により精製した孵化鶏卵しょう尿膜由来の糖脂質と B/Gifu/2/73 の結合性試験の結果を示す写真である。(a : virus(-)、b : orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 試薬により発色、c : B/Gifu/2/73 との結合性; S1 :  $\alpha$ 2-6 シアリルパラグロボシド、S2 :  $\alpha$ 2-3 シアリルパラグロボシド; 1 ~ 5 : AM 番号; 矢印 : B/Gifu/2/73 と特異的に反応した糖脂質)

図 11 は、この出願の発明の実施例において、DEAE-Sephadex A-25 カラムにより調製した孵化鶏卵しょう尿膜由来の糖脂質 (モノシアロおよびジシアロ画分) と各インフルエンザウイルスの結合性試験の結果を示す写真である。(a : orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 試薬による発色、b : resorcinol-HCl 試薬による発色、c : virus(-) (1 次抗体 = anti-P-50)、d : virus(-) (1 次抗体 = USA1)、e : A/PR/8/34 (H1N1 との結合性)、f : A/Aichi/2/68 (H3N2) との結合性、g : A/Memphis/1/71 (H3N2) との結合性; S1 : GSC273 ( $\alpha$ 2-3 sialyl paragloboside)、S2 : GSC275 ( $\alpha$ 2-6 sialyl paragloboside) : #1 : モノシアロ画分、#2 : ジシアロ画分)

図 12 は、しょう尿膜ジシアロ画分による各種インフルエンザウイルスに対する感染阻害作用を示す図である。(ウイルス液のみを加えたときの LDH 活性を 100 % とし、各濃度のジシアロ画分を添加した時の相対活性を示した。)(a : A/PR/8/34 との結合性、b : A/Aichi/2/68 との結合性、c : A/Memphis/1/71 との結合性、d : B/Lee/40 との結合性)

25

## 発明を実施するための最良の形態

この出願の発明者らは、インフルエンザウイルスの遺伝子解析、および宿主への感染に必須なウイルス受容体となるシアロ糖鎖の調査を進め、インフルエンザウイルスがヒトから他の動物へ伝

5 播する仕組みを明らかにしてきた (Ito, T., Suzuki, Y., Takada, A., Kawamoto, A., Otsuki, K., Masuda, H., Yamada, M., Suzuki, T., Kida, H., and Kawaoka, Y.: *Journal of Virology*, 71, 3357-3362 (1997); Suzuki, T., Horiike, G., Yamazaki, Y., Kawabe, K., Masuda, H., Miyamoto, M., Nishimura, S.I.,

10 Yamagata, T., Ito, T., Kida, H., Kawaoka, Y., and Suzuki, Y.: *FEBS Letters*, 404, 192-196 (1997); Ito, T., Suzuki, Y., Mitnaul, L., Vines, A., Kida, H., and Kawaoka, Y.: *Virology*, 227, 493-499 (1997); Suzuki, Y.: Options for the control of influenza III. (Elsevier Science B.V., Brown, L. E., Hampson, A.W., Webster, R. G., editors), 4443-4446 (1996)). そして、

15 ヒト、ブタ、トリ、ウマから分離されるインフルエンザA型ウイルスおよびヒトインフルエンザB型ウイルスは、いずれも共通してシアル酸 (Sialic acid, SA) を含む糖鎖を特異的に認識結合すること、特に、シアリルラクト系 I 型および II 型糖鎖 (I 型

20 糖鎖: SA  $\alpha$  2-6 (3) Gal  $\beta$  1-3GlcNAc  $\beta$  1-; II 型糖鎖: SA  $\alpha$  2-6 (3) Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-) と強く結合することを明らかにした。(Suzuki, Y., Nakao, T., Ito, T., Watanabe, N., Toda, Y., Xu, G., Suzuki, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Yamada, A., et al.: *Virology*, 189, 121-131 (1992); 鈴木康夫: 生化学, 62, 231-260 (1990))

25 さらに、発明者らは、活性のあるシアロ糖鎖でも遊離オリゴ糖として存在する場合にはインフルエンザウイルスへの結合力は

弱い、シアロ糖脂質、シアロ糖タンパク質などとして、脂質あるいはタンパク質に結合した糖鎖として存在する場合、さらに化学合成ポリマー上に上記シアロ糖鎖をクラスター形成して発現させた場合には、飛躍的に高い結合性を表すことを見出した。

5 (Fujimoto, K., Hayashida, O., Aoyama, Y., Guo, C. T., Hidari, K. I. P. J., and Suzuki, Y. : *Chemistry Letter*, 1259-1260 (1999); Akiko Tsuchida, Kazukiyo Kobayashi, Noritaka Matsubara, Tsukasa Muramatsu, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki: *Glycoconjugate J.*, 15, 1047-1054 (1998))

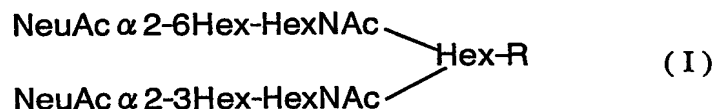
10 さらにまた、A型、B型のインフルエンザウイルスヘマグルチニンの分子進化は、受容体シアロ糖鎖末端のシアル酸結合様式 (SA-2-3Gal, SA2-6Gal) とシアル酸分子種 (Neu5Ac, Neu5Gc) の認識の変化として現れることを見出した。(Suzuki, Y., Kato, H., Naeve, C. W., Webster, R. G. : *Virology*, 63, 4298-4302  
15 (1989); Xu, G., Horiike, G., Suzuki, T., Miyamoto, D., Kumihashi, H., and Suzuki, Y. : *Biochemical and biophysical research communications*, 224, 815-818 (1996)) 例えば、ヒトから MDCK 細胞を用いて分離されたA型 (H1, H3 亜型) およびB型ウイルスは、SA2-6Gal 結合 (以下 2-6 と記述) を認識するのに  
20 対して、カモおよびウマから分離されるウイルスはいずれも SA2-3Gal 結合 (以下 2-3 と記述) に強い親和性を示し、2-6 への結合は弱い。一方、ブタから分離されるウイルスは 2-6 への強い親和性を示すが、2-3 にも結合できる。

そこで、インフルエンザウイルスの受容組織 (ヒト、ブタ、ウ  
25 マは上気道粘膜細胞、カモは腸管粘膜細胞) におけるシアル酸の結合様式および分子種を調査したところ、ブタの上気道細胞には

ヒト、カモウイルス両者に対する受容体シアロ糖鎖（2, 6-、2, 3-の両者）が存在することが明らかになった。すなわち、ブタは自然界においてカモおよびヒトインフルエンザウイルスの中間宿主となり得ることが分子レベルで明らかになったのである。

- 5      しかし、実際に宿主細胞の表面で発現されているシアロ糖鎖（すなわち、特定のレセプター分子）の存在や構造はこれまで明らかにされていなかった。そこで、この出願の発明者らは、鋭意研究により、インフルエンザウイルス感染組織から各種のシアロ糖鎖を抽出し、それぞれのインフルエンザウイルスに対する結合
- 10   性を調べ、本願発明にいたったものである。

すなわち、この出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子は、次の化学式（I）



- （ただし、NeuAc は、その水酸基、カルボキシル基およびアミド
- 15   基が、同一または別異にハロゲン基、アルキル基またはアシル基で化学的に修飾されていてもよい N-アセチルノイラミン酸を表し、Hex はヘキソース、HexNAc は N-アセチルヘキソサミンを表し、R は水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、R は置換基を有していても
- 20   よい）で表されるものである。この出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子は、すなわち、 $\alpha 2, 6$ -結合した NeuAc と Hex-HexNAc と  $\alpha 2, 3$ -結合した NeuAc と Hex-HexNAc を両方有することを特徴とするものである。

- このような化合物において、Hex および HexNAc の種類はとくに
- 25   限定されない。好ましくは、Hex はガラクトース (Gal)、HexNAc



はガラクトサミン (GalNAc) またはグルコサミン (GlcNAc) である。また、NeuAc は、その水酸基、カルボキシル基およびアミド基がハロゲン基 (F、Cl、Br、I)、アルキル基 ( $C_2-C_{20}$ ) およびアシル基 ( $C_2-C_{20}$ ) で化学的に修飾されていてもよい。

5      さらに、この出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子において、N-アセチルノイラミン酸とヘキソース (またはガラクトース) との結合は、天然に存在する O-グリコシド結合のみではなく、S-グリコシド、Se-グリコシド結合等化学的に変換されていてもよい。

10      また、この出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子は、R が水素原子や置換基を有していてもよい炭化水素基である遊離オリゴ糖やその誘導体であってもよいし、R が糖鎖、脂質、タンパク質あるいは合成高分子等であってもよい。前記のとおり、R として脂質、タンパク質、合成高分子等を有し、新規分岐状シアロ糖脂

15      質、新規分岐状シアロ糖タンパク、高分子固定化新規分岐状シアロ糖などを形成している場合には、インフルエンザウイルスに対する結合性が高くなり、好ましい。また、R の構造は、この発明の新規分岐状シアロ糖分子の用途に応じて適宜変更してもよい。

20      この出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子は、公知の多糖類の合成方法によって合成されるものであってもよいし、天然由来のものであってもよい。とくに孵化鶏卵しょう尿膜由来のものを単離して得られるものが例示される。

25      この出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子は、その分子中にすべての型 (A 型、B 型、および A 型インフルエンザウイルスヘマグルチニン亜型) のウイルスが宿主細胞受容体に結合する上で必要な複数のシアロ糖鎖、とくに  $\alpha 2, 6$  - および  $\alpha 2, 3$  - 結合

を同時に有するため、A型のインフルエンザウイルスおよびB型のインフルエンザウイルスのいずれに対しても有効に結合する。

したがって、この出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子は、インフルエンザウイルス感染、ならびにインフルエンザの流行を防止する各種の手段に適用できる。例えば、医薬品（抗ウイルス剤）の有効成分、マスクや空気清浄機等のフィルターにおけるウイルス吸着剤等の用途が挙げられる。例えば抗ウイルス剤として用いる場合には、どのような形態としてもよく、液剤、錠剤、粉末等の経口投与されるものや、点鼻薬、口腔スプレーなどのエアロゾル等として鼻腔や咽頭に直接適用するもの、経皮投与するもの等が例示される。また、フィルター等に充填する場合には、空気中からウイルスを除去し、拡散を防ぐことが可能となる。さらに、カーテン、壁紙などの家庭用品にこの出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子を混合あるいは塗布すれば、ウイルスの除去、拡散防止効果を付与することができる。

この発明の新規分岐状シアロ糖分子は、インフルエンザウイルスに対して従来の直鎖状の糖鎖群と同等かそれ以上の結合性を有し、高い感染防止効果を発揮する。また、前記のとおり、あらゆるインフルエンザウイルスに対して高い結合性を有するために、複数種のインフルエンザが同時に流行したり、新たなインフルエンザウイルスの変異体が発生したりしても、十分な結合性を維持でき、抗ウイルス剤やウイルス吸着剤としての性能を発揮できる点で、従来の直鎖状の糖鎖群よりも有用性が高いといえる。

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細に説明する。もちろん、この出願の発明は、以下の実施例に限定されるものではないことはいうまでもない。

## 実施例

### 実施例 1 インフルエンザウイルスレセプター候補分子の探索

インフルエンザウイルスのレセプターとなる分子を探索、同定  
 5 するために、ウイルスの増殖に用いられる孵化鶏卵のしょう尿膜  
 およびウイルスの分離や感染実験に用いられる犬の腎尿細管細  
 胞（MDCK 細胞）から A 型および B 型のインフルエンザウイルスと  
 反応する脂質性分子を単離することを試みた。

#### I. 実験方法

##### 10 (1) 材料

インフルエンザウイルス株は、表 1 に示すものを使用した。

表1

ウイルス種	血清型	NeuAcへの結合特異性
A/PR/8/34	H1N1	$\alpha 2-6 \ll \alpha 2-3$
A/Aichi/2/68	H3N2	$\alpha 2-6 > \alpha 2-3$
A/Memphis/1/71	H3N2	$\alpha 2-6 \gg \alpha 2-3$
A/Duck/313/4	H5N3	$\alpha 2-6 \doteq \alpha 2-3$
A/Duck/92/1/76	H9N2	$\alpha 2-6 \doteq \alpha 2-3$
B/Lee/40		$\alpha 2-6 \gg \alpha 2-3$
B/Gifu/2/73		$\alpha 2-6 \doteq \alpha 2-3$

なお、表中、N-アセチルノイラミン酸への結合特性は、III  
 に後述する TLC/virus-binding assay により標準糖脂質（シアリ  
 15 ルパラグロボシド）との反応性を調べた結果に基づく値である。  
 また、TLC/virus-binding assay は、発明者らにより確立された  
 方法である。（Suzuki, Y., Nakao, T., Ito, T., Watanabe, N.,  
 Toda, Y., Xu, G. Y., Suzuki, T., Kobayashi, T., Kimura, Y.,

- Yamada, A., Sugawara, K., Nishimura, H., Kitame, F., Nakamura, K., Deya, E., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1992) *Virology* 189, 121-131; Guo, C.-T., Wong, C.-H., Kajimoto, T., Miura, T., Ida, Y., Juneja, L.R., Kim, M.-J., Masuda, H., Suzuki, T., and Suzuki, Y. (1998) *Glycoconjugate J.* 15, 1099-1108)

抗インフルエンザウイルス抗体としては、次の表 2 に示すものを使用した。

表2

ウイルス種	一次抗体*1	二次抗体*2
A/PR/8/34	anti-P-50 (x 1000)	Protein A (x 1000)
A/Aichi/2/68	anti-P-50 (x 1000)	Protein A (x 1000)
A/Memphis/1/71	USA1 (x 500)	Protein A (x 1000)
A/Duck/313/4	anti-P-50 (x 1000)	Protein A (x 1000)
A/Duck/92/1/76	anti-P-50 (x 1000)	Protein A (x 1000)
B/Lee/40	anti-B/Lee (x 4000)	anti-rabbit IgG-HRP (x 2000)
B/Gifu/2/73	anti-B/Lee (x 4000)	anti-rabbit IgG-HRP (x 2000)

\*1: 一次抗体は発明者らにより作製されたウサギポリクローナル抗体

\*2: anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology社)、Protein A (Cappel社) より購入

## (2) インフルエンザウイルスの精製

- 10 PBS で希釈 (A 型インフルエンザウイルス : 2-3~4 ; B 型インフルエンザウイルス : 2-1~0) したウイルス懸濁液を 11 日齢発育鶏卵のしょう尿腔に 0.2 ml 植種し、34℃で 48 時間培養した。

- しょう尿液を回収した後、4℃、4000 rpm (HITACHI SCI 20B, RPR9 ローター) で 10 分間遠心し、夾雑物を除去した。上清をさらに 4℃、  
15 8000rpm で 3 時間遠心し、ペレットを PBS で懸濁して粗ウイルス液とした。次に 50% グリセロール (WAKO) -PBS に粗ウイルス重層し、4℃、38000 rpm (HITACHI CP65β, P40ST ローター) で 2

時間遠心した。再び得られたペレットを PBS で懸濁し、10-40% (w/v) ショ糖連続密度勾配遠心を 4℃、20000 rpm で 90 分 (HITACHI CP65β, P28S ローター) 行った。

5 ウイルスのバンドを回収し、4℃、8000rpm (HITACHI SCR 20B, RPR18 ローター) で 3 時間遠心することにより精製ウイルスを得た。得られたウイルスは PBS で懸濁し、-80℃で保存した。

### (3) 赤血球凝集活性 (HAU) の測定

10 210 倍希釈した精製インフルエンザウイルス 50 μl をマイクロプレート (96U-bottom wells, Falcon) 上にて 0.01 %ゼラチン (nacalai tesque, Inc.) -PBS 50 μl で倍々希釈した。0.5% (v/v) モルモット赤血球-PBS を 50 μl 加え、4℃で 2 時間静置した後、赤血球の凝集を観察した。HAU はモルモット赤血球が凝集するために必要なウイルスの最高希釈倍数で示した。

### (4) しょう尿膜からの反応性脂質の探索

15 11 日齢発育鶏卵 40 個のしょう尿膜を回収し、PBS で洗浄した後、凍結乾燥 (EYELA FDU-830) した。乾燥重量 1.81 g のしょう尿膜に MilliQ 水 15 ml を加え、ホモジナイズした。さらに CHCl<sub>3</sub>/MeOH 60ml を加え、1 時間抽出した後、抽出液をろ過し、エバポレーターで溶媒を留去した。MeOH 60ml を加え、パス式ソニケーター (SILENTSONIC, SHARP) にて超音波処理した後、0.1N NaOH 20 により 37℃で一晩加水分解を行った。溶媒を留去した後、MilliQ 水 20 ml を加え、超音波処理し、透析 (透析膜: VISKASE SALES CORP) を行った。

25 透析後、凍結乾燥したサンプルを CHCl<sub>3</sub>/MeOH/MilliQ 水 (30/60/8, v/v/v) 20ml に溶解させ、超音波処理し、DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーのサンプルとした。

DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia Biotech) は  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.8\text{M}$   $\text{NaOAc}$  (30/60/8, v/v/v) で予め活性化した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30/60/8, v/v/v) で平衡化したものを用いた。Bed volume 10 ml の DEAE-Sephadex A-25 にサンプルを導入し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30/60/8, v/v/v) 100 ml で中性脂質画分を溶出させた後、  
5  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.8\text{M}$   $\text{NaOAc}$  (30/60/8, v/v/v) 100 ml で酸性脂質画分を溶出させた。これらの画分から溶媒を除去し、MilliQ 水 10 ml を加え、超音波処理した後、透析を行った。

透析後、さらに凍結乾燥したサンプルのうち酸性脂質画分の半  
10 量を  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (5/4/1, v/v/v) 0.75 ml に溶解し、  
予め  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (5/4/1, v/v/v) で平衡化し、Iatrobeads  
(bed volume 3 ml) (Iatron Laboratories, Inc.) に導入した。

まず、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (5/4/1, v/v/v) 15ml を流しながら、1 ml ずつ画分を集めた。その後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30/60/8,  
15 v/v/v) 15 ml、MeOH 15ml を流した。これらの画分のうち目的糖  
脂質を含む画分を集め、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1/1, v/v) 1 ml に溶解し、  
後述の II (a) および III の TLC プレーットの二次元展開により分析  
を行った。

予め  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (5/4/1, v/v/v) で平衡化した  
20 Iatrobeads (bed volume 25 ml) に  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (5/4/1,  
v/v/v) で溶解したサンプル 2.5 ml を投与した。 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$   
水 (5/4/1, v/v/v) で 125 ml から  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30/60/8,  
v/v/v) 125 ml へ勾配をかけた溶媒で溶出し、2.5 ml ずつフラク  
ションコレクター (ADVANTEC, SF-3120) で分取した。これらの  
25 フラクションについて、A 型 (ヒト、トリ) および B 型ウイルス  
との反応性を後述の II (b) および III の分析方法で調べた。

結果が認められたフラクションについて、さらに精製するために、全量を HPTLC (MERCK, HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60) プレートに投与し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2/15 \text{ M NH}_4\text{OH}$  (50/40/7/3, v/v/v/v) にて展開し、得られた 4 つのバンドをメス (KEISEI MEDICAL INDUSTRIAL CO., LTD) で掻き取った。掻き取ったバンドは、それぞれ  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (5/4/1, v/v/v) 1 ml を加えて 5 分間超音波処理した後、パスツールで綿栓ろ過した。さらに綿栓に  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30/60/8, v/v/v) 2 ml を流して先のろ液と合わせた。この溶媒を留去した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/$  (1/1, v/v) 100  $\mu\text{l}$  を加え、後述の II (c) および III の方法により TLC プレートにて分析を行った。

#### (5) MDCK 細胞からの反応性脂質の探索

MDCK 細胞 (10 cm dish 25 枚) を confluent になるまで培養し、収集した。得られた細胞のペレットを凍結乾燥し (乾燥重量 0.06 g)、MilliQ 水 600  $\mu\text{l}$  を加えた。さらに、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1/1, v/v) 6 ml を加え、1500 rpm (TOMY, LC-100) で 5 分間遠心し、得られた上清の溶媒を留去した。MeOH 3 ml を加え、超音波処理した後、0.1 N NaOH で 37℃ で一晩加水分解を行った。溶媒を留去した後、MilliQ 水 2.5 ml を加え、超音波処理し、透析を行った。

透析後、凍結乾燥したサンプルを  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30/60/8, v/v/v) 20 ml に溶解させ、超音波処理し、DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーのサンプルとした。DEAE-Sephadex A-25 は、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.8 \text{ M NaOAc}$  (30/60/8, v/v/v) で予め活性化した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30/60/8, v/v/v) に置換したものをを用いた。Bed Volume 10 ml の DEAE-Sephadex A-25 にサンプルを投与し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30/60/8, v/v/v)

100 ml で中性脂質画分を溶出させた。

その後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.8 \text{ M NaOAc}$  (30/60/8, v/v/v) 100 ml で酸性脂質画分を溶出させた。これらの画分の溶媒を留去し、MilliQ 水 2.5 ml を加えて超音波処理した後、透析を行った。透析後、凍結乾燥した酸性脂質画分を  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1/1, v/v) 100  $\mu\text{l}$  に溶解し、II (a) および III の TLC プレーットの二次元展開により分析を行った。

## II. TLC の化学発色試薬による検出

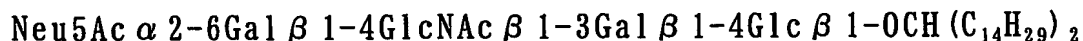
(a) 二次元展開：プラスチック TLC プレート (MERCHEREY-NAGEL, Polygram Sil G) はアセトンで展開した後、得られた酸性脂質画分と標準糖脂質 (bovine brain total gangliosides) を投与した。この TLC プレーートを  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/88\% \text{ HCOOH}$  (65/25/10, v/v/v) にて一次元で展開した後よく風乾し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/5 \text{ N NH}_4\text{OH}$  で二次元展開を行った。プレートを風乾した後、orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  試薬 (1 % (w/v) orcinol/2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) を噴霧して 110℃ に加熱し、糖の検出を行った。

二次元展開の結果、ウイルスとの反応性が認められた画分については、さらに精製するために上記の Iatrobeads カラムクロマトグラフィーで得られた画分と酸性脂質画分の残りの半量を合わせて再度 Iatrobeads カラムクロマトグラフィーを行った。

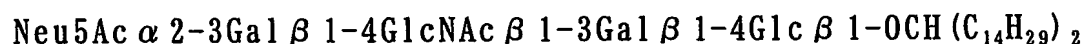
(b) 一次展開：プラスチック TLC プレート上に得られた酸性脂質画分と標準糖脂質 (GSC-275、GSC-273、bovine brain total gangliosides) を投与した。この TLC プレーートをアセトンで展開した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2$  (5/4/1, v/v/v) にて展開した。プレートを風乾した後、orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  試薬を噴霧して 110℃ に加熱し、糖の検出を行った。



なお、GSC-275 は、次の〔1〕に示す合成品の  $\alpha$  2, 6-sialyl paragloboside であり、GSC-273 は、〔2〕に示す合成品の  $\alpha$  2, 3-sialylparagloboside である。



5 . . . .〔1〕



. . . .〔2〕

(c) 一次展開：プラスチック TLC プレート上に得られた糖脂質画分と標準糖脂質（前記 orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  試薬）を投与した。この  
10 TLC プレートをアセトンで展開した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2/15 \text{ M NH}_4\text{OH}$  (50/40/7/3, v/v/v/v) にて展開した。プレートを風乾後、  
orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  試薬を噴霧して  $110^\circ\text{C}$  に加熱し、糖の検出を行った。

### III. TLC/virus-binding assay

II (a) ~ (c) と同様に展開した TLC プレートを 1% ovalbumin, 1%  
15 polyvinylpyrrolidone (PVP) (東京化成) -PBS 溶液（以下 A 液とする）で室温にて 1 時間振盪した。PBS で  $4^\circ\text{C}$ 、5 分間、3 回洗浄した後、 $\text{HAU}=27$  になるように PBS で希釈したインフルエンザウイルス懸濁液 3 ml を加え、 $4^\circ\text{C}$  にて一晩振盪した。なお、virus (-) にはウイルス懸濁液の代わりに PBS を加えた。

20 これを PBS で  $4^\circ\text{C}$ 、5 分間、3 回洗浄し、3% PVP-PBS 溶液（以下 B 液とする）で希釈した一次抗体溶液 3 ml を加えて、 $4^\circ\text{C}$  で 2 時間振盪した。このプレートを PBS で  $4^\circ\text{C}$ 、5 分間、3 回洗浄した後、B 液で希釈した二次抗体溶液 3 ml を加えて  $4^\circ\text{C}$  で 2 時間振盪した。その後、PBS で  $4^\circ\text{C}$ 、5 分間、3 回洗浄し、発色基質溶液 (0.1M  
25 citratate buffer pH 6.0, 5 ml; 0.11 mM 4-chloro-1-naphthol in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $100 \mu\text{l}$ ; 0.06 M DEPDA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $100 \mu\text{l}$ ;  $100 \mu\text{l}$ ; 30%

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 μl) を加えて室温で振盪した。発色後、精製水で洗浄、風乾した。

#### IV. 結果

孵化鶏卵のしょう尿膜より脂質を抽出し、酸性脂質画分を TLC で二次元展開後、糖の検出試薬である orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 試薬で発色させた (図 1 c)。同様にして展開したプレートを A/PR/8/34 (図 1 d)、A/Aichi/2/68 (図 1 e)、B/Lee/40 (図 1 f)、B/Gifu/2/73 (図 1 g) と反応させたところ、ウイルスに共通して反応する箇所が確認された。(図中矢印で表示)

移動度から、この共通して反応した画分は、シアリルパラグロボシドとは異なる分子である、より長い糖鎖構造を有する物質であることが示唆された。

そこで、この画分をさらに精製するために、Iatrobeads カラムクロマトグラフィーを行った。図 2 a に得られたパターンを示した。

1 ~ 7 のフラクションについて、A 型では、A/Memphis/1/71 (図 2 c)、A/PR/8/34 (図 2 d)、A/Aichi/2/68 (図 2 e)、A/Duck/313/4 (図 2 f)、A/Duck/92/1/76 (図 2 g)、B 型では、B/Lee/40 (図 2 h) を用いて反応性を検討した。

Neu5Ac α 2-6Gal 結合の糖鎖構造と強く反応する A/Memphis/1/71 (図 2 c) は、フラクション 2 ~ 6 と反応しており、フラクション 2 の矢印で示したバンドは非常にシャープであった。Neu5Ac α 2-6Gal 結合の糖鎖構造と同程度に結合する A/Aichi/2/68 (図 2 e) も A/Memphis/1/71 と同様にフラクション 2 の矢印で示したバンドと強く反応していた。このバンドは、A/Duck/313/4 (図 2 f)、A/Duck/92/1/76 (図 2 g)、B/Lee/40 (図

2 h) にも反応しており、ヒト A 型および B 型インフルエンザウイルスに共通して反応するだけでなく、H5、H9 のトリウイルスにも反応することが明らかになった。

そこで、この反応性脂質をさらに精製するために、フラクシ  
5   ン 2 について HPTLC にて掻き取りを行ったところ、図 3 a に示すようなパターンが得られた。このバンドは、A/Memphis/1/71 (図 3 b)、A/PR/8/34 (図 3 c) と反応することが確認された。

一方、MDCK 細胞からも同様にして脂質を抽出し、酸性脂質画分  
10   を TLC で二次元展開した後、orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 試薬で発色させたところ、図 4 a のようなパターンが得られた。同様に展開したプレートを A/PR/8/34 (図 4 c)、A/Aichi/2/68 (図 4 d)、B/Lee/40 (図 4 e)、B/Gifu/2/73 (図 4 f) と反応させたところ、矢印で示した部分がすべてのウイルスに共通して反応することがわかった。

この反応性脂質は、しょう尿膜で反応した画分 (図 1) と同様  
15   の移動度であることが明らかとなった。

## 実施例 2

実施例 1 より、孵化鶏卵のしょう尿膜、MDCK 細胞中に含まれる  
特定の脂質性分子が A 型および B 型のインフルエンザウイルス  
20   と反応することが確認された。この脂質性分子の構造や結合特異性を調べるために、さらに大きなスケールで単離、精製を行った。最終的に単離された脂質性分子のインフルエンザウイルスとの結合特異性を既にウイルスとの結合性が報告されている標準糖脂質であるシアリルパラグロボシドと比較検討した。

### 25   I. 実験方法

#### (1) 材料

インフルエンザウイルス株は、表 3 に示すものを使用した。

表3

ウィルス種	血清型	NeuAcへの結合特異性
A/PR/8/34	H1N1	$\alpha 2-6 \ll \alpha 2-3$
A/Aichi/2/68	H3N2	$\alpha 2-6 > \alpha 2-3$
A/Memphis/1/71	H3N2	$\alpha 2-6 \gg \alpha 2-3$
B/Lee/40		$\alpha 2-6 \gg \alpha 2-3$
B/Gifu/2/73		$\alpha 2-6 \approx \alpha 2-3$

なお、表中 N-アセチルノイラミン酸への結合特性は、実施例 1 に示した TLC/virus-binding assay により標準糖脂質であるシ  
5 アリルパラグロボシドとの反応性を調べた結果に基づく値である。

さらに、抗インフルエンザウイルス抗体としては、次の表 4 に示すものを使用した。

表4

ウィルス種	一次抗体	二次抗体
A/PR/8/34	anti-P-50 (x 1000)	Protein A (x 1000)
A/Aichi/2/68	anti-P-50 (x 1000)	Protein A (x 1000)
A/Memphis/1/71	USA1 (x 500)	Protein A (x 1000)
B/Lee/40	anti-B/Lee (x 4000)	anti-rabbit IgG-HRP (x 2000)
B/Gifu/2/73	anti-B/Lee (x 4000)	anti-rabbit IgG-HRP (x 2000)

## 10 (2) しょう尿膜から目的脂質の精製

11 日齢発育鶏卵 1150 個からしょう尿膜を採取し、PBS で洗浄した後凍結乾燥した。乾燥重量 67.7 g のしょう尿膜にアセトン 800 ml を加え、10 分間超音波処理を行った。ホモジナイザーにて粉碎した後、室温で 3 時間攪拌した。抽出液をろ過し、乾燥さ

せた残渣に  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (5/5/1, v/v/v) 2750 ml を加え、10 分間超音波処理を行った。一晚攪拌した後、ろ過した残渣に  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30/60/8, v/v/v) 1200 ml を加え、2 時間攪拌した。

- 5 さらに、ろ液を先のろ液と合わせてエバポレーターで溶媒を留去した。MeOH 300 ml を加え、超音波処理した後、最終濃度 0.1 N NaOH となるように調製し、37℃、3.5 時間さらに室温で一晩加水分解を行った。最終濃度 0.1 N となるように調製した AcOH で中和した後、溶媒を留去した。MilliQ 水 80 ml を加え、超音波処理
- 10 した後、透析を行った。透析後、凍結乾燥したサンプルを  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30/60/8, v/v/v) 100 ml に溶解し超音波処理した後、ろ過した。残渣に再び  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30/60/8, v/v/v) 100 ml を加え、同様の操作を 2 回行った。3 回のろ液を合わせて DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーのサン
- 15 プルとした。DEAE-Sephadex A-25 は、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.8 \text{ M NaOAc}$  (30/60/8, v/v/v) で予め活性化した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30/60/8, v/v/v) で平衡化したものを用いた。

- Bed volume 440 ml の DEAE-Sephadex A-25 にサンプルを投与し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30/60/8, v/v/v) 20 l で中性脂質画分を
- 20 溶出させた。その後  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.05 \text{ M NaOAc}$  (30/60/8, v/v/v) 9 l を流してモノシアロ酸性脂質画分とした (Suzuki, Y., Nakao, T., Ito, T., Watanabe, N., Toda, Y., Xu, G., Suzuki, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Yamada, A., et al.: *Virology*, 189, 121-131 (1992))。

- 25 モノシアロ、ジシアロ以上の画分は MilliQ 水 150 ml を加えて透析を行った。透析後、凍結乾燥したジシアロ以上の画分を

CHCl<sub>3</sub>/MeOH/MilliQ 水 (65/25/4, v/v/v) 10 ml に溶解した。ジシアロ以上の画分をさらに精製するため、Iatrobeads カラムクロマトグラフィーによりを行った。Iatrobeads は CHCl<sub>3</sub>/MeOH/MilliQ 水 (65/25/4, v/v/v) で予め活性化したものを用いた。Bed volume  
5 120 ml の Iatrobeads にサンプルを投与し、CHCl<sub>3</sub>/MeOH/MilliQ 水 (65/25/4, v/v/v) 250 ml を流した。その際、フラクションコレクターにて 2.5 ml ずつ 100 本のフラクションをとり、HPTLC プレートで溶出画分の確認を行った。HPTLC プレートの展開溶媒は CHCl<sub>3</sub>/MeOH/12 mM MgCl<sub>2</sub> (5/4/1, v/v/v) にて展開、確認を行っ  
10 た。また、ウイルスとの反応性を前記実施例 1 と同様の方法により調べ、反応性を有する画分のみを集めた。

これらの画分を CHCl<sub>3</sub>/MeOH/MilliQ 水 (5/4/1, v/v/v) 1 ml に溶解し、さらに精製するため再度 Iatrobeads カラムクロマトグラフィーを行った。Iatrobeads は CHCl<sub>3</sub>/MeOH/MilliQ 水 (5/4/1, v/v/v) で予め活性化したものを用いた。  
15

Bed volume 25 ml の Iatrobeads にサンプルを投与し、CHCl<sub>3</sub>/MeOH/MilliQ 水 (5/4/1, v/v/v) 75 ml を流した。その際、フラクションコレクターにて 0.25 ml ずつ 300 本のフラクションをとった。これらのフラクションを HPTLC プレートに投与し、  
20 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/12 mM MgCl<sub>2</sub> (5/4/1, v/v/v) にて展開、マッピングを行った。

その結果、CHCl<sub>3</sub>/MeOH/MilliQ 水 (5/4/1, v/v/v) では目的の脂質性分子が溶出されなかったため、続いて CHCl<sub>3</sub>/MeOH/MilliQ 水 (40/50/9, v/v/v) 25 ml を流し、0.25 ml ずつ 100 本のフラ  
25 クションをとった。

これらのフラクションを HPTLC プレートに投与し、

- CHCl<sub>3</sub>/MeOH/12 mM MgCl<sub>2</sub> (5/4/1, v/v/v) にて 20 cm 展開、分かれた 5 つのバンドをメスで掻き取った。それぞれのバンドを CHCl<sub>3</sub>/MeOH/MilliQ 水 (30/60/8, v/v/v) 40 ml で抽出し、5 分間超音波処理を行った。その後、シリカゲルを除くために綿栓ろ過し、溶媒を留去した。CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8/2, v/v) 1 ml に溶解し、Iatrobeads カラムクロマトグラフィーを行なった。Iatrobeads は CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8/2, v/v) で活性化し、Bed volume 1ml とした。サンプルを投与した後、CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8/2, v/v) 15 ml、続いて CHCl<sub>3</sub>/MeOH/MilliQ 水 (30/60/8, v/v/v) 20 ml を流した。
- 10 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/MilliQ 水 (30/60/8, v/v/v) により溶出された画分の溶媒を留去し、CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1/1, v/v) 200  $\mu$ l に溶解した。得られた画分を HPTLC プレートに投与し、展開溶媒 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/12 mM MgCl<sub>2</sub> (5/4/1, v/v/v) にて展開、orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 試薬で発色させた。
- 15 これらの画分を A M 1 ~ 5 と名付け、最終精製標品とした。A M 1 ~ 5 について、A 型および B 型インフルエンザウイルスとの結合特異性を標準糖脂質であるシアリルパラグロボシドと比較した。

## II. 結果

- 20 ジシアロ以上の画分について 1 回目の Iatrobeads カラムクロマトグラフィーを行った結果を図 5 に示した。
- 溶出フラクションを TLC プレートにて展開、糖の検出試薬である orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 試薬で発色させた。得られた 1 ~ 7 のフラクションについて、ウイルスとの反応性を調べ、図 6 に結果を示した。
- 25 A/Aichi/2/68 (図 6 c) はフラクション 4 および 5 と強く反応し、A/Memphis/1/71 (図 6 d) はフラクション 4、5、6 と特に

強く反応した。図 5 の矢印で示した部分がとくに強く反応することがわかったことから、この部分を多く含むフラクション 4～6 をプールし、2 回目の Iatrobeads カラムクロマトグラフィーを行った。

- 5 得られたパターンを図 7 に示した。矢印で示した部分がとくに目的糖脂質を多く含んでいたことからフラクション 5 と 6 を集め、さらに精製した。

なお、フラクション 5 および 6 は別々に精製し、以下フラクション 6 のみについて HPTLC プレートを用いて 20 cm 展開した。その結果、ブロードに見えていたバンドが少なくとも 5 つの糖脂質の混合物であることが明らかになった。そこで、これら 5 つのバンドを掻き取り、シリカゲルを除いた後、糖の発色を調べた。図 8 に得られたパターンを示した。これら 5 つのフラクションを A M 1～5 と名付け、最終精製標品とし、A 型および B 型インフルエンザウイルスとの結合特異性を標準糖脂質であるシアリルパラグロボシドと比較した。

A M 1～5 について、A 型では A/Aichi/2/68、A/PR/8/34、A/Memphis/1/71 を用いて検討した。Neu5Ac  $\alpha$  2-3Gal および Neu5Ac  $\alpha$  2-6Gal 結合の糖鎖構造と同程度に結合する A/Aichi/2/6 は A M 1～5 のすべての脂質性分子に反応し、A M 1 の矢印の移動度に観察されるバンド、および A M 3、4 と強く反応した (図 9 c)。

なお、図 9 では、実施例 3 に後述する方法で質量分析を行うことができた。A M 1、3、4 については、標準糖脂質である  $\alpha$  2-3 シアリルパラグロボシド、 $\alpha$  2-6 シアリルパラグロボシドと同量を投与した。標準糖脂質と比較すると A M 1 の矢印のバンドは、 $\alpha$  2-3 シアリルパラグロボシドより少し強く反応している。A M



3、4は、 $\alpha$ 2-6 シアリルパラグロボシドとほぼ同等の強さで結合している。

一方、Neu5Ac  $\alpha$ 2-3Gal 結合の糖鎖構造のみと結合する A/PR/8/34 (図9 d) は A/Aichi/2/68 (図9 c) と同様にAM1  
5 の矢印のバンドと強く反応した。したがって、これは、 $\alpha$ 2-3 シアリルパラグロボシドと比較して非常に強いインフルエンザウイルス結合性を持つことが示された。また、A/Aichi/2/68 (図9 c) とは異なり、AM1から5の上の方の移動度に観察されるバンドとは反応しなかった。さらに、Neu5Ac  $\alpha$ 2-6Gal 結合の糖鎖構造のみと結合する A/Memphis/1/71 (図9 e) は A/Aichi/2/68 (図  
10 9 c) と似たようなパターンを示した。

AM1はAichi/2/68、A/PR/8/34と同じように反応し、その反応性は、 $\alpha$ 2-6 シアリルパラグロボシドより少し弱かった。AM3、4は、 $\alpha$ 2-6 シアリルパラグロボシドと同程度か、もしくは  
15 それ以上に反応していた。これらの結果から、AM1の矢印バンドは3つのウイルスに共通して強く反応しており、その反応性は標準糖脂質と同程度かもしくはそれより強いことが分かった。

また、AM1～5について、B型インフルエンザウイルスとの反応性を調べた結果を図10に示した。Neu5Ac  $\alpha$ 2-3Gal および  
20 Neu5Ac  $\alpha$ 2-6Gal 結合の糖鎖構造と同程度に結合する B/Gifu/2/73 (図10 c) は、1～5のすべてのフラクションと反応した。A型の3種類のウイルスと同様に、AM1の矢印のバンドとも反応することが明らかになった。AM1は標準糖脂質の $\alpha$ 2-3 および  
25  $\alpha$ 2-6 シアリルパラグロボシドよりも強く反応していた。また、AM1～3の上の方の移動度に観察されるバンドとは反応しなかった。

### 実施例 3 質量分析法による A M 1、3、4 の構造解析

A M 1 ~ 5 のうち、質量分析が可能であった A M 1、3、4 の構造を解析するために、ESI (electrospray ionization) -FTMS (Fourier transform ion resonance mass spectrometer) 測定  
5 および SIMS (secondary ion mass spectroscopy) -FTMS 測定 (いずれも BioAPEX (Bruker instruments)) を行った。

#### I. 実験

##### (1) ESI-FTMS

A M 1、3、4 の各サンプルをメタノールに溶解 (3 pmol/ $\mu$ l)  
10 し、マイクロシリンジポンプを用いて 1  $\mu$ l/min の流速にてスプレーを行った。cylinder、endoplate、capillary 等の ESI high voltage controller やスプレーノズルを調製した後、negative-ion mode にて測定を行った。

##### (2) SIMS-FTMS

15 サンプルを CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2/1, v/v) に溶解し、そのうち一定量 (300 pmol) を取り出してマトリックス (triethanolamine) と混合した後、accelerating voltage 10 kV、negative-ion mode にて測定を行った。

#### II. 結果

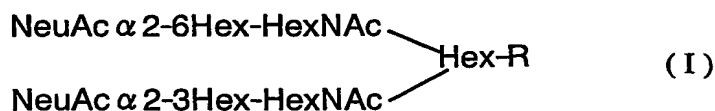
20 分子量関連イオンピークと考えられる m/z 2195 [M+Na-2H]<sup>-</sup>とそこからシアル酸 [-NeuAc-Na] 1 個がはずれた m/z 1882 [M-NeuAc-H]<sup>-</sup>が確認された。さらに、シアル酸関連ピークである m/z 290 [NeuAc]<sup>-</sup>、m/z 308 [NeuAc]<sup>-</sup>が低分子領域で認められた。また、2 価イオン領域に m/z 1086 [M-2H]<sup>2-</sup>が認められ、ここから  
25 計算される分子量が先に述べた分子量関連イオンピークの質量数と一致することから、シアル酸が二個含まれている可能性が

示唆された。

この2個のシアル酸の結合に関して、GD1a および GD1b のスペクトルを参考に解析したところ、GD1b が有する NeuAc-NeuAc では認められた  $m/z$  581、 $m/z$  603 が AM 1 では認められないことから、これらのシアル酸はそれぞれ単独で中性糖に結合していると考えられる。また、分子量関連イオンピーク  $m/z$  2195 はセラミド (LCB18:1-FA16:0)、中性糖が6個 (ヘキソースが4個、ヘキサミンが2個)、シアル酸が2個、Na が1個付加した組み合わせであることが示された。

- さらに、SIMS-FTMS 測定からもセラミドに相当する  $m/z$  536 (LCB18:1-FA16:0) が認められた。また、このセラミドにヘキソースが1個ずつ付加したピークに相当する  $m/z$  698、 $m/z$  860、さらにヘキソサミンが付加したピークに相当する  $m/z$  1063、ヘキソースが付加したピークに相当する  $m/z$  1225 が確認された。これより AM 1 はラクトサミン骨格を有していることが示された。

以上より、インフルエンザウイルスの宿主となる孵化鶏卵のしょう尿膜から、レセプター候補となる分子を単離することに成功した。また、構造解析よりこのレセプター分子は、次式 (I)



- (ただし、NeuAc は、その水酸基、カルボキシル基およびアミド基が、同一または別異にハロゲン基、アルキル基またはアシル基で化学的に修飾されていてもよい N-アセチルノイラミン酸を表し、Hex はヘキソース、HexNAc は N-アセチルヘキソサミンを表し、R は水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、R は置換基を有していても

よい) で表されることが確認された。

#### 実施例 4 各種インフルエンザウイルスに対する結合性の検討

##### I. 実験方法

##### 5 (1) 材料

インフルエンザウイルス株は、表 5 に示したものを使用した。

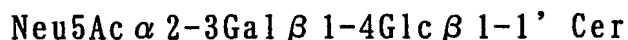
表5

ウイルス種	血清型	NeuAcへの結合特異性
A/PR/8/34	H1N1	$\alpha 2-6 \ll \alpha 2-3$
A/Aichi/2/68	H3N2	$\alpha 2-6 > \alpha 2-3$
A/Memphis/1/71	H3N2	$\alpha 2-6 \gg \alpha 2-3$

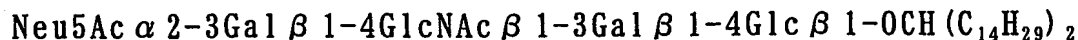
10 なお、NeuAc への結合特異性は、本願の発明者らにより確立された前記の TLC/virus-binding assay を利用して、標準糖脂質である sialylparagloboside に対する各ウイルス株の反応性を調べた結果に基づいている。

また、標準糖脂質としては、以下のに示したものをを用いた。

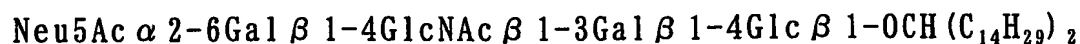
• GM3



15 • GSC-273 (synthetic)



• GSC-275 (synthetic)



さらに、抗インフルエンザウイルス抗体としては、次の表 6 に  
20 示したものをを用いた。

表6

ウィルス種(血清型)	一次抗体* <sup>1</sup>	二次抗体* <sup>2</sup>
A/PR/8/34 (H1N1)	anti-P-50 (× 1000) * <sup>3</sup>	Protein A (× 1000)
A/Aichi/2/68 (H3N2)	anti-P-50 (× 1000)	Protein A (× 1000)
A/Memphis/1/71 (H3N2)	USA1 (× 500)	Protein A (× 1000)

\*1: 一次抗体は発明者らにより作製されたウサギポリクローナル抗体

\*2: anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology社)、Protein A (Cappel社)より購入

\*3: ( )内は実験に使用した希釈倍率を示す。

## (2) インフルエンザウィルスの精製

滅菌 PBS で希釈したウィルス懸濁液 (A 型インフルエンザウィルスは、赤血球凝集活性 (HAU) =  $2^{-3} \sim -4$ 、B 型インフルエンザウィルスは、赤血球凝集活性 (HAU) =  $2^{-1} \sim 0$  となるように希釈した) を  
5 11 日齢発育鶏卵のしょう尿腔に 0.2 ml 植種し、34℃で 48 時間培養した。

しょう尿液を回収した後、4℃、4000 rpm (HITACHI SCR 20B, RPR9  
ローター) で 10 分間遠心し、夾雑物を除去した。上清をさらに 4℃、  
10 8000 rpm で 3 時間遠心し、ペレットを PBS で懸濁して粗ウィルス液とした。次に 50%グリセロール-PBS 溶液に粗ウィルス液を重層し、4℃、38000 rpm (HITACHI CP65  $\beta$ , P40ST ローター) で 2 時間遠心した。

得られたペレットを PBS で懸濁し、4℃、15000 rpm で 1 時間遠  
15 心した。再び得られたペレットを PBS で懸濁した後、10~40%(w/v) ショ糖連続密度勾配遠心を 4℃、20000 rpm で 90 分 (HITACHI CP65  $\beta$ , P28S ローター) 行なった。ウィルスのバンドを回収し、4℃、8000 rpm (HITACHI SCR 20B, RPR18 ローター) で 3 時間遠心することにより精製ウィルスを得た。

得られたウイルスは PBS で懸濁し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### (3) HAU 測定

2<sup>10</sup> 倍希釈した精製インフルエンザウイルス 50  $\mu\text{l}$  をマイクロプレート (96U-bottom wells, Falcon) 上にて 0.01 %ゼラチン (nacalai tesque, Inc.)-PBS 50  $\mu\text{l}$  で倍々希釈した。0.5 % (v/v) モルモット赤血球-PBS を 50  $\mu\text{l}$  加え、 $4^{\circ}\text{C}$  で 2 時間静置した後、赤血球の凝集を観察した。HAU はモルモット赤血球が凝集するために必要なウイルスの最高希釈倍数で表した。

### (4) 孵化鶏卵しょう尿膜からのジシアロ糖脂質画分の調製

11 日齢孵化鶏卵 120 個からしょう尿膜を採取し、PBS で洗浄した後、凍結乾燥した。乾燥しょう尿膜に acetone 100 ml を加え、10 分間 sonication を行った。homogenizer にて粉碎した後、室温で 3 時間攪拌し、得られた抽出液をろ過して残渣を乾燥させた後、この残渣に  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (5:5:1, v/v/v) 660 ml を加え、10 分間 sonication を行った。

一晩攪拌した後ろ過し、残渣に  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30:60:8, v/v/v) 300 ml を加え 2 時間攪拌した。ろ液を先のろ液とあわせ、エバポレーターで溶媒を留去した。乾固物に MeOH 50 ml を加え sonication してよく懸濁後、最終濃度 0.1 N となるように NaOH 溶液を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 3.5 時間、さらに室温で一晩加水分解を行なった。最終濃度 0.1 N となるように AcOH を加えた後、溶媒を留去した。乾固物に MilliQ 水 25 ml を加え sonication した後、透析を行なった。透析後、凍結乾燥したサンプルを 50 ml の  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30:60:8, v/v/v) に溶解し sonication した後、ろ過した。

残渣に再び  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30:60:8, v/v/v) 20 ml を

加え同様の操作を行なった。2 回のろ液をあわせて DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィー用のサンプルとした。DEAE-Sephadex A-25 は  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.8 \text{ M NaOAc}$  (30:60:8, v/v/v) であらかじめ活性化した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30:60:8, v/v/v) で平衡化したものを用いた。Bed volume 100 ml の DEAE-Sephadex A-25 column にサンプルをアプライし、次に  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$  水 (30:60:8, v/v/v) 3 L カラムに流して中性脂質画分を溶出した。

その後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.05 \text{ M NaOAc}$  (30:60:8, v/v/v) 3.5 L をカラムに流し、モノシアロ酸性脂質画分を溶出した。さらに  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.8 \text{ M NaOAc}$  (30:60:8, v/v/v) 2 L をカラムに流し、ジシアロ以上の酸性脂質画分を溶出した。モノシアロおよびジシアロ以上の画分はそれぞれエバポレーターで溶媒を留去した。モノシアロ画分には MilliQ 水 20 ml、ジシアロ以上の画分には MilliQ 水 20 ml をそれぞれ加えて、透析を行なった。透析後、凍結乾燥したそれぞれの画分を  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1:1, v/v) 1000  $\mu\text{l}$  に溶解した。両画分についてインフルエンザウイルスとの結合性を TLC/virus-binding assay により検討した。

#### (5) TLC/virus binding assay

プラスチック TLC プレート上に、孵化鶏卵のしょう尿膜から DEAE-Sephadex A-255 カラムクロマトグラフィーにより調製したモノシアロ、ジシアロ画分および標準糖脂質をアプライした後、このプレートをアセトンで展開、風乾し、同じ方向に  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2$  (5:4:1, v/v/v) で連続して展開、風乾した。

このプレートを 1% ovalbumin, 1% polyvinylpyrrolidone (PVP) (東京化成) 含有 PBS 溶液 (以下、Solution A) 中で室温にて 1

時間振盪し、冷 PBS で 4℃、5 分間、3 回洗浄した。ここに HAU =  
2<sup>7</sup> となるように PBS で希釈したインフルエンザウイルス懸濁液 4  
mL を添加し、4℃で一晩振盪した。なお virus (-) にはウイルス懸  
濁液の代わりに PBS を加えた。冷 PBS で 4℃、5 分間、3 回洗浄後、  
5 3 % PVP 含有 PBS 溶液 (以下 Solution B) で希釈した一次抗体溶  
液 4 mL を加えて 4℃で 2 時間振盪し、冷 PBS で 4℃、5 分間、3  
回洗浄後、Solution B で希釈した二次抗体溶液 4 mL を加え 4℃  
で 2 時間振盪した。反応後、冷 PBS で 4℃、5 分間、3 回洗浄し、  
発色基質溶液 (0.1 M citrate buffer pH 6.0, 5mL; 0.11 M  
10 4-chloro-1-naphthol in CH<sub>3</sub>CN, 100 μL; 0.06 M DEPD in CH<sub>3</sub>CN,  
100 μL; 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 μL) を加え、室温で振盪した。発色後、  
プレートを精製水で洗浄、風乾した。

別の展開、風乾したプレートに orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 試薬を噴霧して  
110℃に加熱し、糖の検出を行った。同様にして、別のプレート  
15 に resorcinol-HCl 試薬を噴霧して加熱し、シアル酸の検出を行  
い、デンストメーター (SHIMADZU) により各バンド成分の含有量を  
定量した。

## II. 実験結果

孵化鶏卵のしょう尿膜より得られた酸性糖脂質画分 (モノシア  
20 ロおよびジシアロ画分) を TLC にアプライして展開し、  
resorcinol-HCl 試薬で発色させ、それぞれの画分中に含まれる成  
分の存在量を測定した。図 1 1 a および図 1 1 b に示す TLC パタ  
ーンが観察された。デンストメーターによる定量により、それぞ  
れの成分の存在比を算出した (図 1 1 b のプレートの両側に示し  
25 た)。同様にしてそれぞれの画分をスポット、展開したプレートを  
A/PR/8/34 (H1N1)、A/Aichi/2/68 (H3N2)、A/Memphis/1/71 (H3N2)



のウイルス株とそれぞれ反応させた (図 11 e ~ g)。

その結果、図中矢印で示した部分に存在する極性の高い糖脂質が全てのウイルスに共通して反応することがわかった。

5 本願発明者らは既に、ジシアロ画分よりレセプター候補分子を単離しており、以上より、矢印で示した物質はその移動度が候補分子に極めて近いことから、レセプター候補分子そのものであることが示唆された。

さらに、resorcinol-HCl 試薬によるプレートのデンストメーターによる定量から、今回調製したジシアロ画分中に含有されるレセプター候補分子は、1 % 以下 (シアル酸量比) であることが明らかとなった。

## 実施例 5 各種インフルエンザウイルスに対する感染阻害活性

15 I. 実験方法 LDH 試験法によるインフルエンザウイルス感染阻害活性測定

96well 培養用マイクロプレート (Nunc) に MDCK 細胞を  $2 \times 10^4$  cells/well となるようにまきこみ、10 % FCS 含有 MEM 培地 100  $\mu$ L 中で、37℃、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で 20 ~ 24 時間培養した。

20 次に、孵化鶏卵のしょう尿膜より調製したジシアロ画分を、最終濃度が総シアル酸量として 0.1、0.3、1、3、10  $\mu$ M となるようにそれぞれ無血清 MEM 培地で希釈して 50  $\mu$ L とし、同じく無血清 MEM 培地で希釈したインフルエンザウイルス液および control としてウイルス液を含まない無血清 MEM 培地 50  $\mu$ L を加え、4℃で 1 時間 preincubation した。

25 細胞が confluent monolayer になっているのを確認した後、細胞を無血清 MEM 培地 100  $\mu$ L で 3 回洗浄し、preincubation してお

いたウイルス液および無血清 MEM 培地 100  $\mu$ L を加え、34.5℃、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で 4 時間静置してウイルスを感染させた。

感染後、上清を除去し、無血清 MEM 培地 100  $\mu$ L で 1 回洗浄してから 5 % FCS 含有 MEM 培地 100  $\mu$ L を加え、34.5℃、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で 20～24 時間培養した。新しいマイクロプレート（96 Flat-Bottom Maxisorp, Nunc）に（5×）PBS 10  $\mu$ L を入れ、20～24 時間培養した細胞上清 40  $\mu$ L を加えて混和し、37℃で 5 分間 incubation した後、LDH 測定試薬（シノテスト社製）50  $\mu$ L を加えて混和して 37℃で 10 分間反応させた。

- 10 0.5N HCl 100  $\mu$ L を加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー（MTP-32, corona 社）により測定波長 550nm、対照波長 415 nm にて各 well の吸光度を測定した。ウイルス感染により細胞障害性が生じ、その結果、培養上清中に細胞内酵素である LDH が放出される。これを測定することにより、ウイルスの感染性を  
15 評価できる。

コントロールサンプル（テストサンプルを何も含まないウイルスのみ）の上清中の LDH 活性を 100 %とした時の各濃度のジシアロ画分含有サンプルの上清中の LDH 活性の相対値を阻害活性の指標とした。

## 20 II. 実験結果

- しょう尿膜より得られたジシアロ画分をウイルス液と preincubation し、MDCK 細胞に対するウイルス感染性への影響を LDH 活性測定により調べた。ウイルス液のみを加えたときの LDH 活性を 100 %とし、各濃度のジシアロ画分を添加した時の相対活性  
25 性を図 1 2 に示した。

A/PR/8/34 (H1N1)、A/Aichi/2/68 (H3N2) に対するジシアロ画分

の TCID<sub>50</sub> (50 % of tissue culture infectious dose、50% 阻害濃度) が 1  $\mu$ M (シアル酸濃度) であり、A/Memphis/1/71 (H3N2)、B/Lee/40 のそれは 3  $\mu$ M (シアル酸濃度) であった。

ここで、前述した TLC/virus binding assay の結果 (図 11) と比較してみると、各ウイルスに共通して結合性がある糖脂質、すなわちレセプター物質が実際のジシアロ画分中の阻害活性物質と考えられ、その量はジシアロ画分中の総シアル酸量の 1~10 % 以下であることが明らかとなっている。

以上より、分枝状シアロ糖鎖レセプター糖脂質は、実際には 0.1 ~ 0.3  $\mu$ M 以下というわずかな量で、ウイルスの MDCK 細胞に対する感染を阻害する効果を発揮しうることが示唆された。

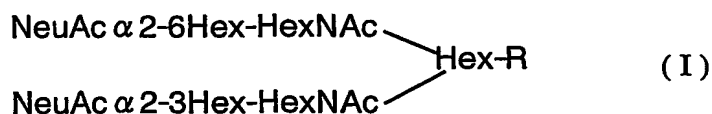
これまでに報告されているウイルス結合活性を有する化合物のインフルエンザウイルス感染阻害効果 (TCID<sub>50</sub>) は 10  $\mu$ M オーダーであり、それに比して、孵化鶏卵しょう尿膜ジシアロ画分に含まれる分枝状シアロ糖鎖レセプター糖脂質ははるかに高い抗インフルエンザウイルス活性を示すことが明らかとなった。

#### 産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明により、新規な分岐状シアロ糖分子が提供される。この化合物は、すべてのヒトおよび動物由来の A 型インフルエンザウイルスおよび B 型インフルエンザウイルスに結合できることから、インフルエンザウイルスの宿主域の変異や抗原性の変異に対応でき、あらゆるインフルエンザウイルスの感染を阻止できる医薬品やウイルス除去用フィルター等の吸着剤として有用性が高い。

## 請求の範囲

## 1. 次式 (I)



- 5 (ただし、NeuAc は、その水酸基、カルボキシル基およびアミド基が、同一または別異にハロゲン基、アルキル基またはアシル基で化学的に修飾されていてもよい N-アセチルノイラミン酸を表し、Hex はヘキソース、HexNAc は N-アセチルヘキソサミンを表し、R は水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、R は置換基を有していてもよい)

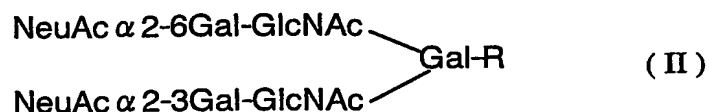
10 で表されることを特徴とする新規分岐状シアロ糖分子。

2. N-アセチルノイラミン酸とヘキソースは、天然の O-グリコシド結合により結合している請求項 1 の新規分岐状シアロ糖分子。

3. N-アセチルノイラミン酸とヘキソースの結合は、化学的に変換された結合である請求項 1 の新規分子状シアロ糖分子。

4. N-アセチルノイラミン酸とヘキソースの結合形態は、S-グリコシド結合または Se-グリコシド結合である請求項 3 の新規分子状シアロ糖分子。

## 5. 次式 (II)

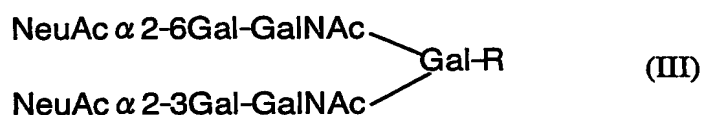


(ただし、NeuAc は、その水酸基、カルボキシル基およびアミド基が、同一または別異にハロゲン基、アルキル基またはアシル基

で化学的に修飾されていてもよいN-アセチルノイラミン酸を表し、Gal はガラクトース、GlcNAc はN-アセチルグルコサミンを表し、R は水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、R は置換基を有していてもよい)

で表されることを特徴とする新規分岐状シアロ糖分子。

6. 次式 (III)



(ただし、NeuAc は、その水酸基、カルボキシル基およびアミド基が、同一または別異にハロゲン基、アルキル基またはアシル基で化学的に修飾されていてもよいN-アセチルノイラミン酸を表し、Gal はガラクトース、GalNAc はN-アセチルガラクトサミンを表し、R は水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、R は置換基を有していてもよい)

で表されることを特徴とする新規分岐状シアロ糖分子。

7. N-アセチルノイラミン酸とガラクトースは、天然の O-グリコシド結合により結合している請求項 5 または 6 のいずれかの新規分岐状シアロ糖分子。

8. N-アセチルノイラミン酸とガラクトースの結合は、化学的に変換された結合である請求項 5 または 6 のいずれかの新規分子状シアロ糖分子。

9. N-アセチルノイラミン酸とガラクトースの結合形態は、S-グリコシド結合または Se-グリコシド結合である請求項 8 の新規分子状シアロ糖分子。

10. 少なくとも請求項 1 ないし 9 のいずれかの新規分岐状シアロ糖分子を有効成分として含有することを特徴とする抗ウイルス剤。

図 1

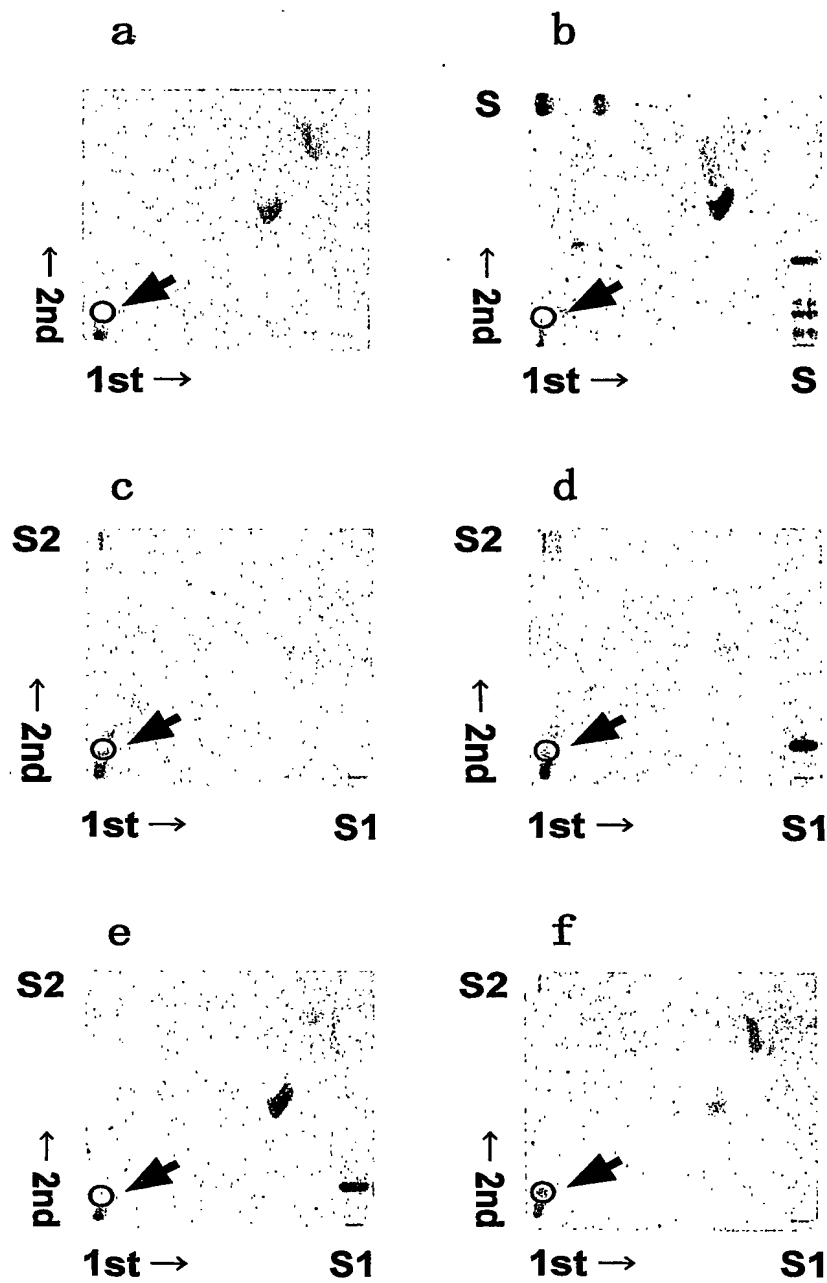


図 2

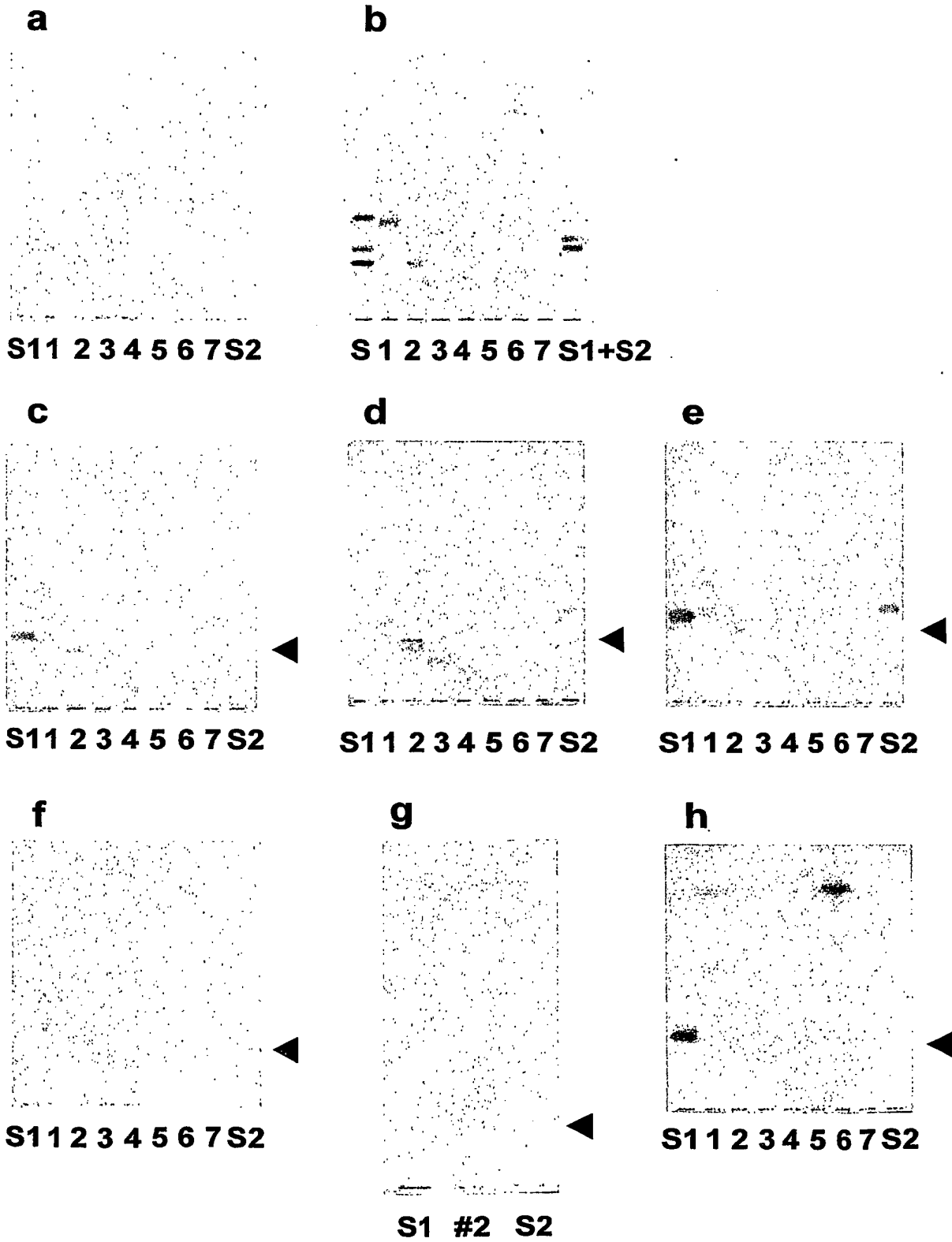




図 3

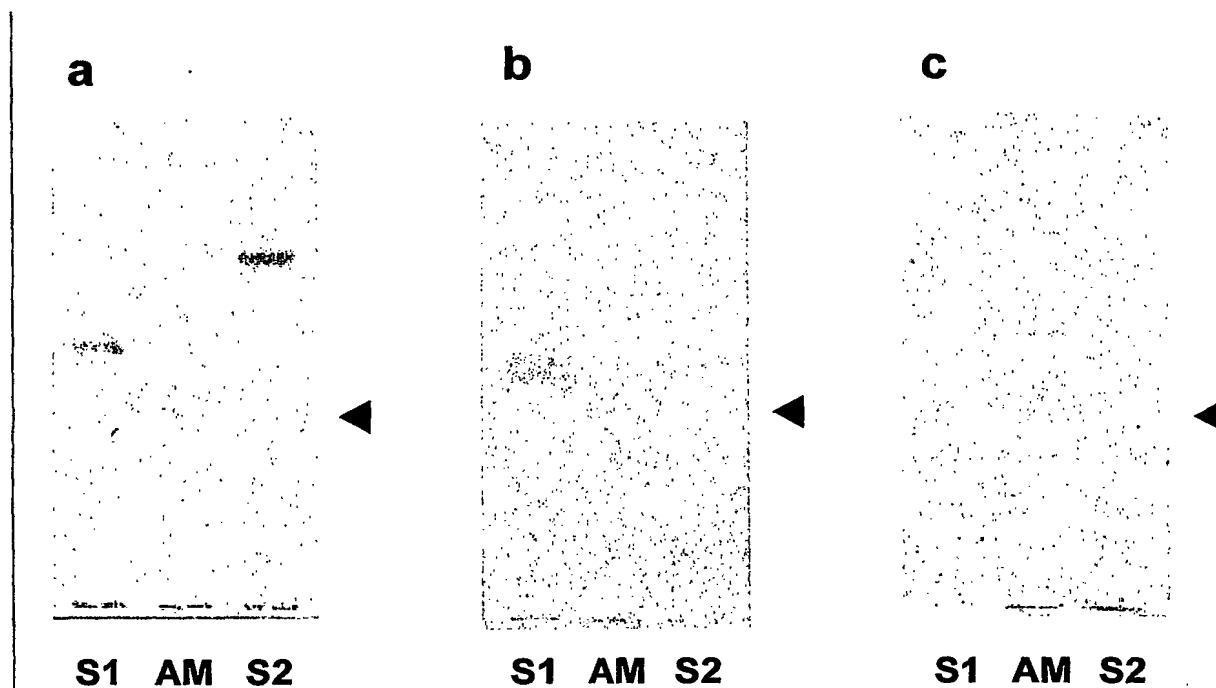


図 4

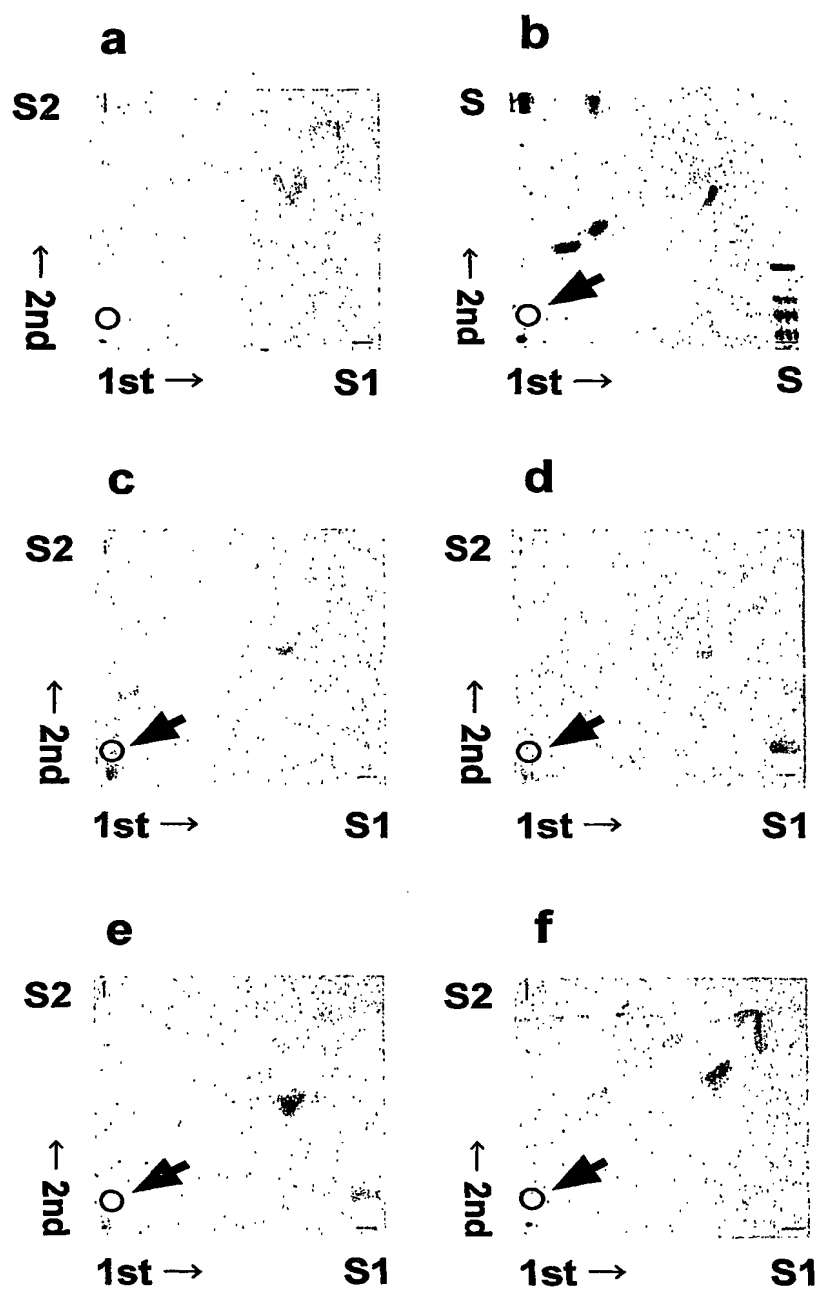


図 5

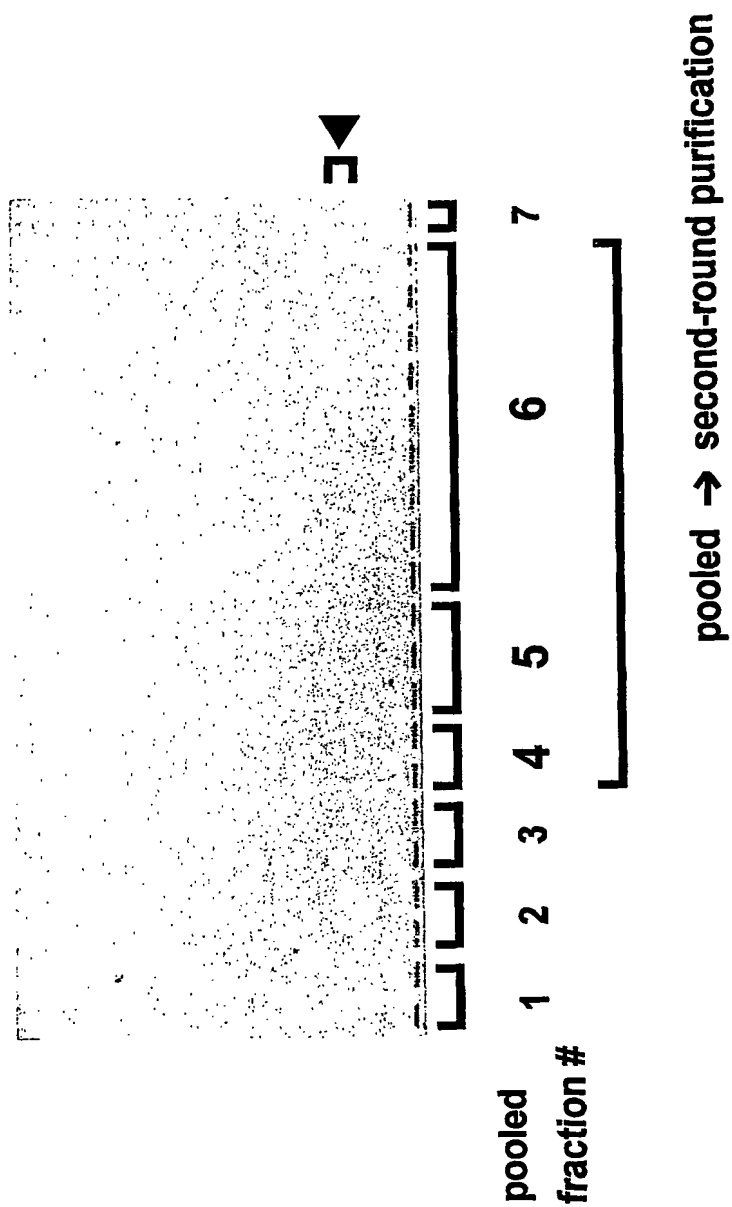


図 6

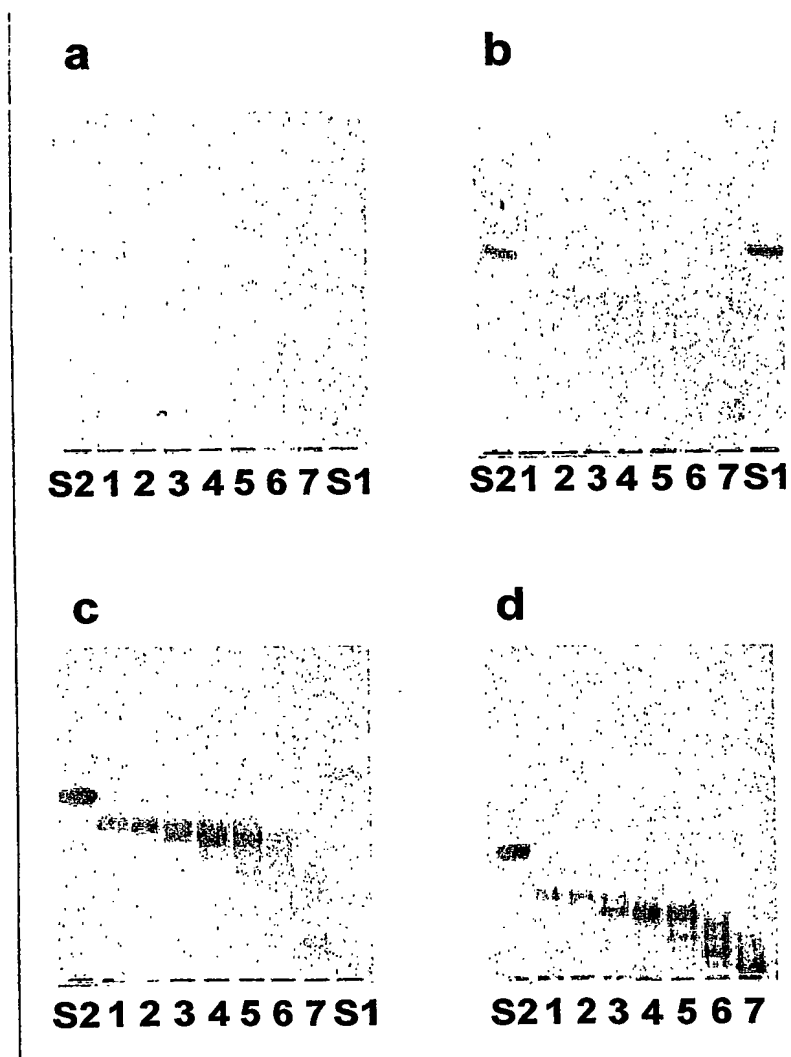


図 7

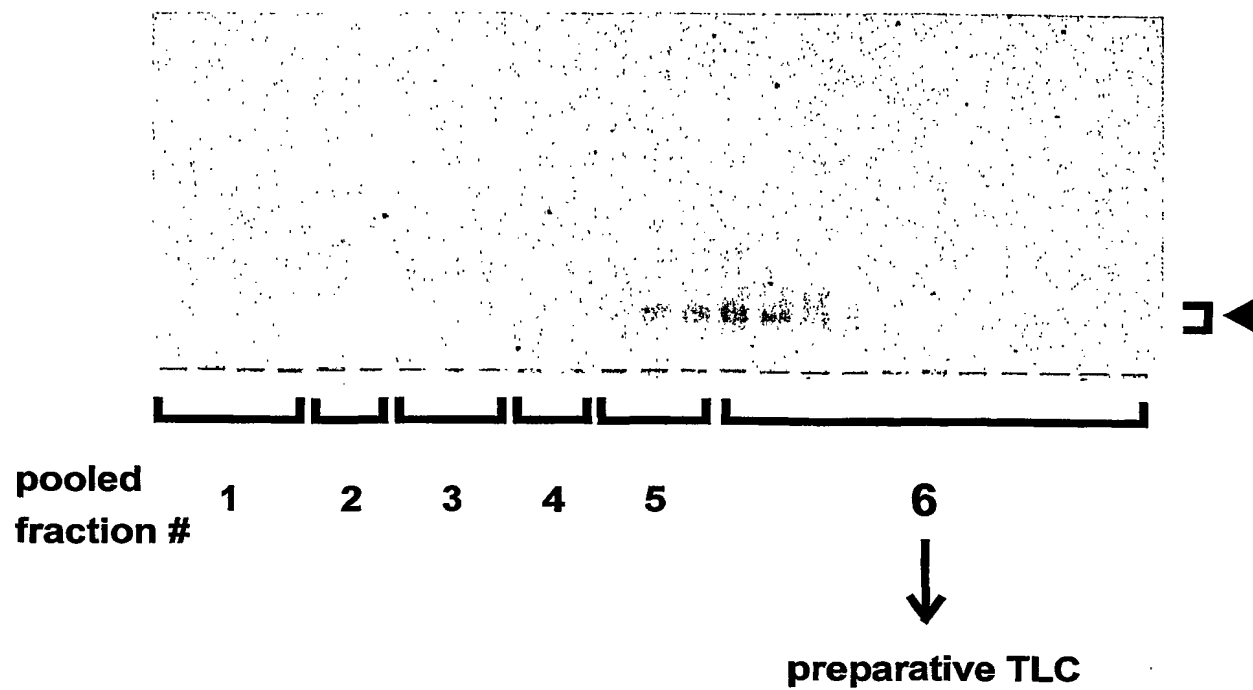


図 8

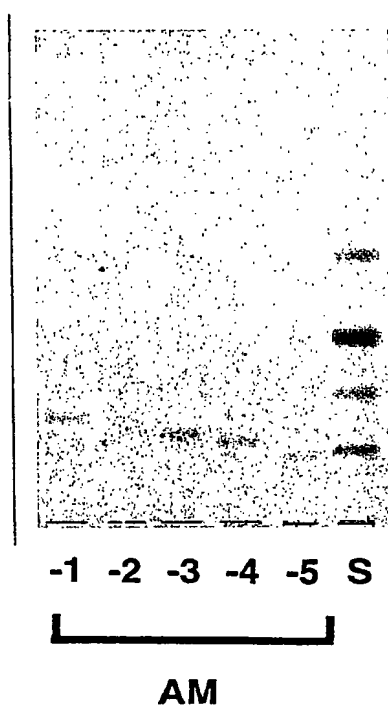


図 9

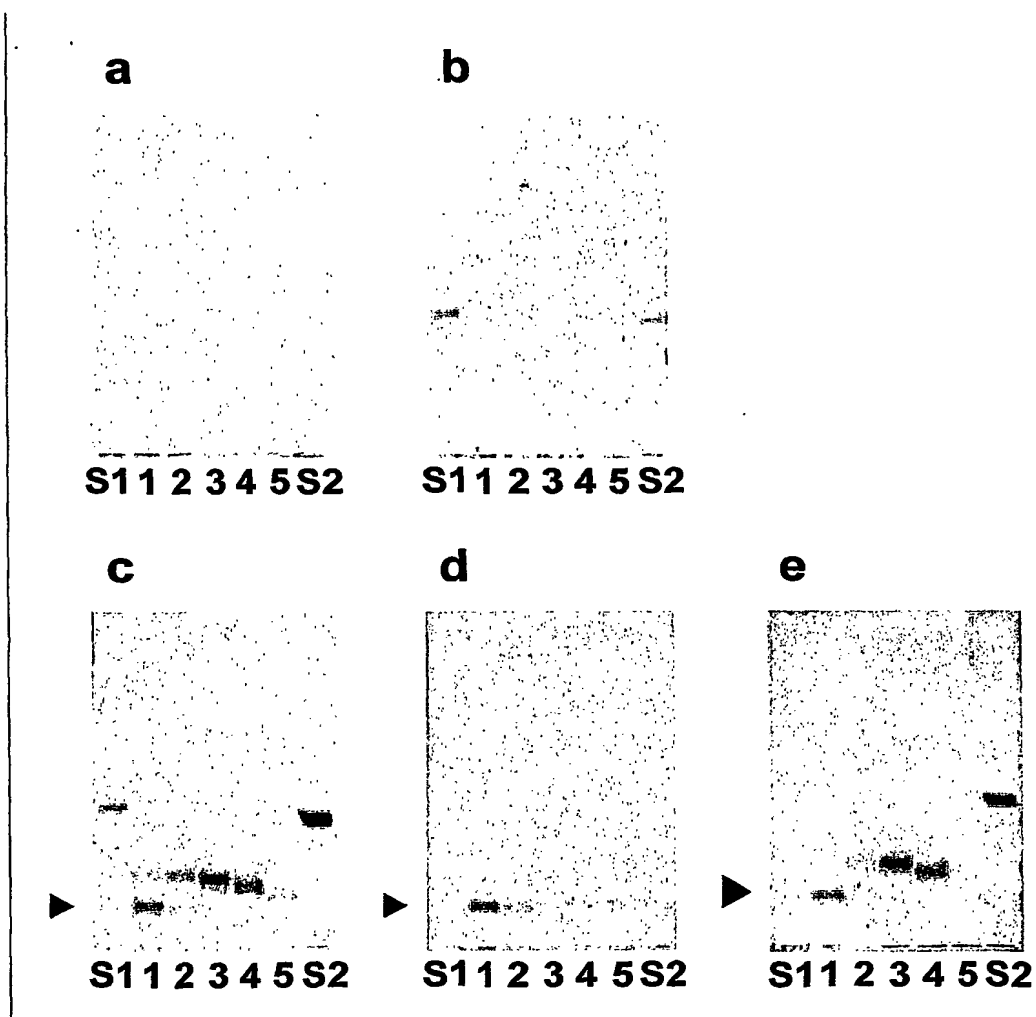


図 10

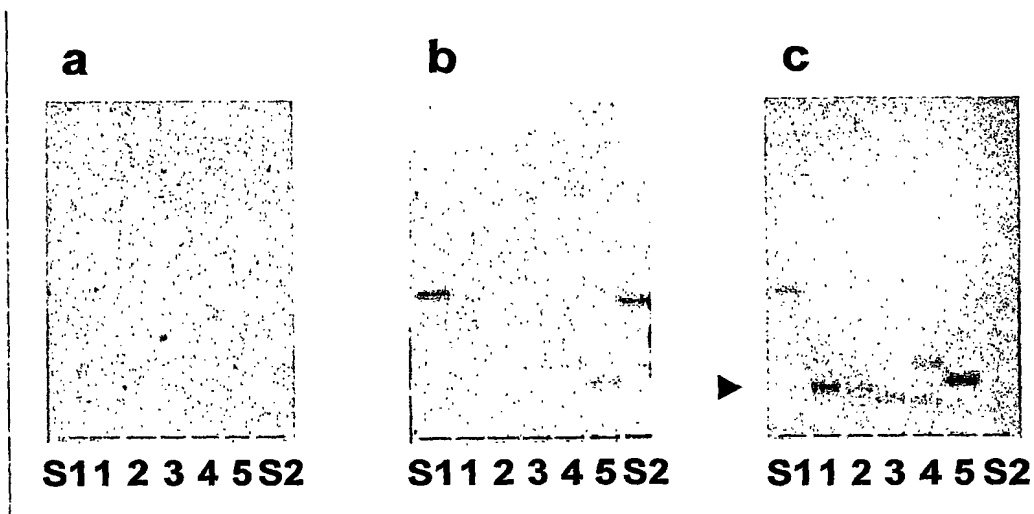




図 1 1

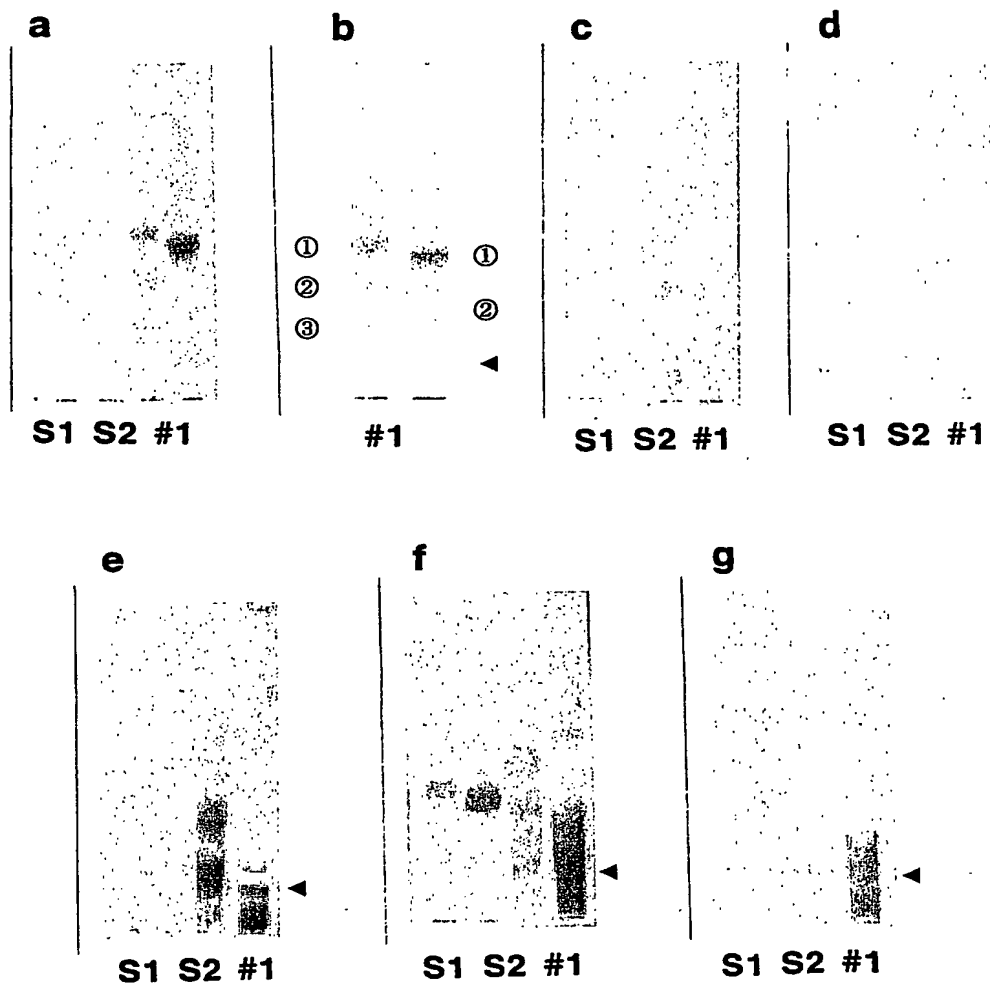
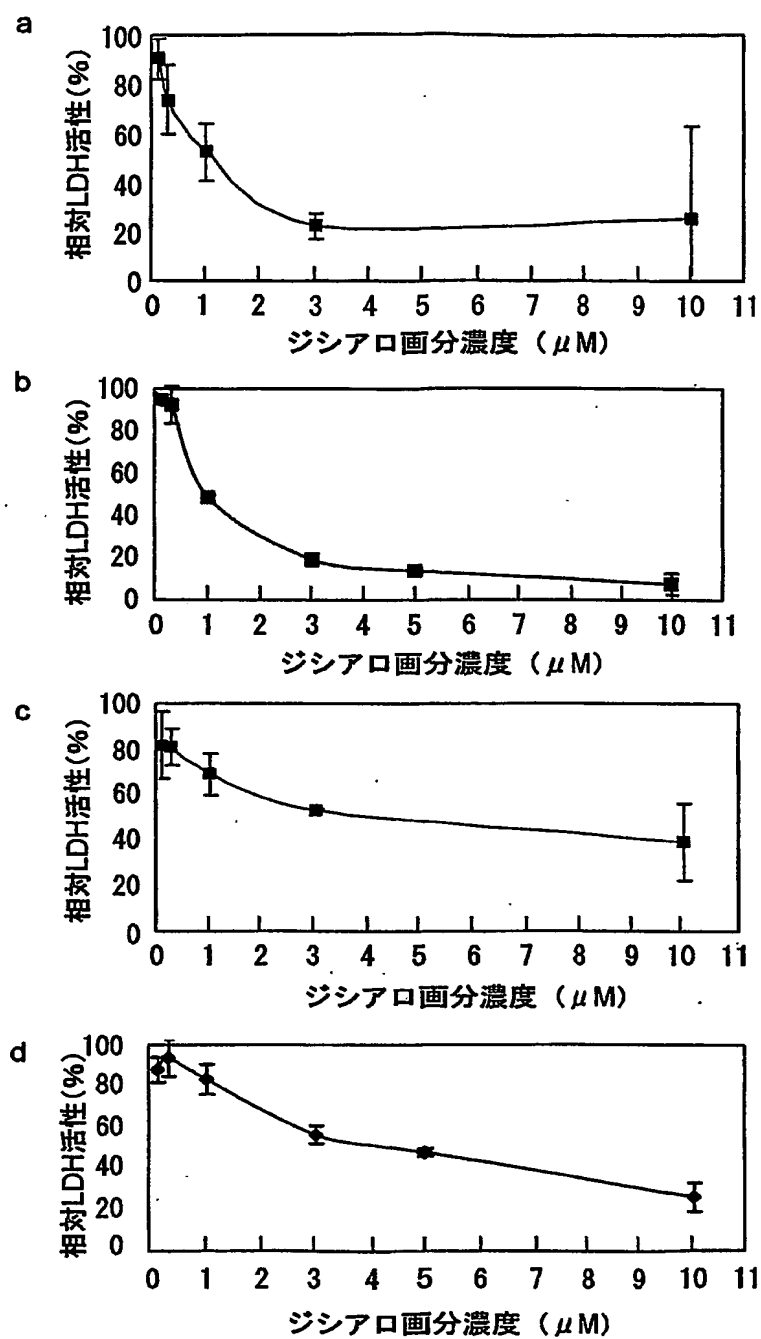


図 1 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/JP03/02338

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> C08B37/00, A61K31/715, A61P31/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C08B37/00, A61K31/715

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Van Pelt, Johannes; Hard, Karl; Kamerling Johannis P.; Vliegenthart, Johannes F.G.; Reuser, Arnold J. J.; Galjaard, Hans, Isolation and structural characterization of twenty-one sialyloligosaccharides from galactosialidosis urine. An intact N,N'-diacetylchitobiose unit at the reducing end of a diantennary structure, Biological Chemistry Hoppe-Seyler (1989), 370(3), 191-203	1, 2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search  
03 April, 2003 (03.04.03)

Date of mailing of the international search report  
22 April, 2003 (22.04.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/02338

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Strecker, Gerard; Peers, Marie Claire; Michalski, Jean Claude; Hondi-Assah, Theophile; Fournet, Bernard; Spik, Genevieve; Montreuil, Jean; Farriaux, Jean Pierre; Maroteaux, Pierre; Durand, Paolo, Structure of nine sialyl-oligosaccharides accumulated in urine of eleven patients with three different types of sialidosis. Mucopolipidosis II and two new types of mucopolipidosis, European Journal of Biochemistry (1977), 75(2), 391-403	1,2
A	Unverzagt, Garlo; Kelm, Soerge; Paulson, James C., Chemical and enzymic synthesis of multivalent sialoglycopeptides, Carbohydrate Research (1994), 251, 285-301	1-10

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C08B37/00, A61K31/715, A61P31/16

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C08B37/00, A61K31/715

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Van Pelt, Johannes; Hard, Karl; Kamerling, Johannis P.; Vliegthart, Johannes F. G.; Reuser, Arnold J. J.; Galjaard, Hans, Isolation and structural characterization of twenty-one sialyloligosaccharides from galactosialidosis urine. An intact N,N'-diacetylchitobiose unit at the reducing end of a di antennary structure, Biological Chemistry Hoppe-Seyler (1989), 370(3), 191-203	1, 2
X	Strecker, Gerard; Peers, Marie Claire; Michalski, Jean Claude; Hondi-Assah, Theophile; Fournet, Bernard; Spik, Genevieve	1, 2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.04.03

国際調査報告の発送日

22.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一



4P

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	; Montreuil, Jean; Farriaux, Jean Pierre; Maroteaux, Pierre; Durand, Paolo, Structure of nine sialyl-oligosaccharides accumulated in urine of eleven patients with three different types of sialidosis. Mucopolipidosis II and two new types of mucopolipidosis, European Journal of Biochemistry (1977), 75(2), 391-403	1-10
	Unverzagt, Carlo; Kelm, Soerge; Paulson, James C., Chemical and enzymic synthesis of multivalent sialoglycopeptides, Carbohydrate Research (1994), 251, 285-301	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**